

Die Wirkung von IGF1 auf Zellen des parodontalen Ligaments unter Einfluss von Hypoxie und Entzündung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jan Reckenbeil

aus

Schmalkalden

Bonn, Januar 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Götz
2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 19.09.2012

Erscheinungsjahr: 2012

Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Götz für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Förderung der Arbeit.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Dieter Fürst für die Begutachtung sowie die Unterstützung während der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Jäger für die zusätzliche finanzielle Unterstützung des Projektes.

Ganz besonders möchte ich Dr. Jochen Winter und Dr. Dominik Kraus danken, die mir während des Projektes mit vielen hilfreichen Diskussionen und praktischen Ratschlägen zur Seite standen.

Dr. Stilla Frede danke ich für die Ermöglichung der Hypoxieversuche und der Sauerstoffverbrauchsmessungen sowie für die Durchsicht der Arbeit, wertvolle Tipps und finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Herrn PD Dr. Gregor Kirfel und Frau Cäcilia Hennes danke ich für die Tipps und die praktische Einführung in die Immunfluoreszenztechnik.

Frau Dr. Rath-Deschner danke ich für die Unterstützung während der Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kollegen für die schöne Zeit im Labor.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
Kurzzusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1 Einleitung	5
1.1 Der Zahnhalteapparat	5
1.2 Das parodontale Ligament	6
1.3 Parodontale Erkrankungen.....	9
1.3.1 Parodontitis	11
1.4 Hypoxie	13
1.4.1 Struktur und Regulation von HIF-1	14
1.5 Das Signalsystem der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren	
(IGF-System).....	19
1.5.1 Die Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2	21
1.5.2 Die Rezeptoren	22
1.5.3 Die IGF-Bindungsproteine.....	23
1.6 Ziel der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterial, Plastik- und Glasware	28
2.1.3 Chemikalien	29
2.1.4 Kits	30

2.1.5	Rekombinante Wachstumsfaktoren und Zytokine	31
2.1.6	Antikörper	31
2.1.7	Oligonukleotide	31
2.1.8	Software und Online-Tools	33
2.1.9	Puffer und Lösungen	33
2.2	Zellkultur	35
2.2.1	Isolierung von PDL-Zellen aus der Wurzelhaut extrahierter Zähne	35
2.2.2	Splitten der Zellen	36
2.2.3	Einfrieren der Zellen	36
2.2.4	Auftauen der Zellen	36
2.2.5	Gewinnung von Überständen für ELISA	37
2.3	Charakterisierung der Zellen	38
2.3.1	Zellmorphologie	38
2.3.2	Grundexpression ausgewählter Gene	38
2.3.3	Messung des Sauerstoffbedarfs von humanen PDL-Zellen	38
2.4	Stimulationsversuche	40
2.4.1	Nachweis von HIF-1 α mittels Immunofluoreszenz	40
2.4.2	Proliferations-Tests	41
2.4.3	Wundheilungsexperimente	42
2.4.4	Differenzielle Genexpression in PDL-Zellen	43
2.4.5	IGF1 ELISA	47
2.5	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Charakterisierung der PDL-Zellen	49
3.1.1	Zellmorphologie	49
3.1.2	Grundexpression ausgewählter Gene	49
3.1.3	Messung des Sauerstoffverbrauchs von PDL-Zellen	50

3.2	Stimulationsversuche	53
3.2.1	Nachweis von HIF-1 α mittels Immunofluoreszenz	53
3.2.2	Proliferations-Tests	54
3.2.3	Wundheilungsexperimente.....	56
3.2.4	Differenzielle Genexpression in PDL-Zellen.....	58
3.2.5	IGF1 ELISA.....	75
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	78
4	Diskussion	79
4.1	Charakterisierung der PDL-Zellen	79
4.1.1	Konfluente PDL-Zellkulturen können osteogen differenzieren	79
4.1.2	PDL-Zellen zeigen eine hohe Expression an IGFBPs-2 bis -6	80
4.1.3	PDL-Zellen haben einen geringen Sauerstoffbedarf	80
4.1.4	Entzündung führt zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch	80
4.2	Nachweis von HIF-1 α	81
4.2.1	HIF-1 α transloziert unter 0,5 % Sauerstoff in den Zellkern.....	81
4.2.2	IL-1 β fördert die die Anreicherung an HIF-1 α -Protein	82
4.3	Proliferation	82
4.3.1	Hypoxie und IGF1 haben einen positiven Einfluss auf die DNA-Synthese	82
4.3.2	Hypoxie beeinflusst die Proliferation positiv, IL-1 β negativ	83
4.4	Wundheilungsexperimente.....	84
4.4.1	IGF1 hat einen positiven Einfluss auf die Wundheilung unter normoxischen, hypoxischen sowie entzündlichen Bedingungen.....	84
4.5	Differenzielle Genexpression in PDL-Zellen.....	85
4.5.1	IGF1, IL-1 β und Hypoxie haben einen Einfluss auf die Expression von Differenzierungsmarkern und Differenzierungsinhibitoren.....	85
4.5.2	IGF1, IL-1 β und Hypoxie haben einen Einfluss auf die Expression von Komponenten des IGF-Systems	90

4.5.3	IGF1, IL-1 β und Hypoxie haben einen Einfluss auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, sowie von HIF-1 α und VEGFA.....	98
4.6	IGF1 ELISA.....	101
4.7	Zusammenfassung:.....	103
	Literaturverzeichnis	105
	Abbildungsverzeichnis	129
	Tabellenverzeichnis	130
	Verfassererklärung.....	131

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
ALS	Acid-labile subunit
AP-1	Activator protein 1
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATF-3	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3
ATP	Adenosine triphosphate
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein
BMP	Bone morphogenetic protein
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumine
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CamK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CBP	CREB-binding protein
CDH	Cadherin
CREB	cAMP response element (CRE)-binding protein
CREG	cellular repressor of E1A-stimulated genes
Cul2	Cullin-2
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor

FHL	Four and a half LIM domains protein
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H2B	Histon 2B
HCl	Hydrochloric acid
HIF	Hypoxia-inducible factor
HOX	Hypoxie
HRE	Hypoxia response element
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat shock protein
ID	Inhibitor of differentiation/DNA-binding
IGF	Insulin-like growth factor
IGF1R	Insulin-like growth factor receptor 1
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IL-1 β	Interleukin 1 β
IP3	Inositol trisphosphate
IRS	Insulin receptor substrate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Potassium chloride
KH ₂ PO ₄	Potassium dihydrogen phosphate
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)
MMP	Matrix metalloprotease
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Na ₂ EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
Na ₂ HPO ₄	Disodium hydrogen phosphate
NaCl	Sodium chloride
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Sodium hydroxide
N-Cadherin	Neuronal cadherin

NFκB	Nuclear factor κB
NLS	Nuclear localization signal
NOX	Normoxie
Nur77	Nerve growth factor 1B
OB-Cadherin	Osteoblast cadherin
ODDD	Oxygen-dependend degradation domain
PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline / Tween 20
PDL	Periodontal ligament
PFA	Paraformaldehyde
PHD	Prolyl hydroxylase domain-containing protein
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKC	Protein kinase C
PLCγ	Phospholipase Cγ
PSA	Prostate-specific antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTH1R	Parathyroid hormone receptor 1
RACK1	Receptor of activated protein kinase C 1
RAR	Retinoic acid receptor
Rbx1	RING-box protein 1
rhIGF	Recombinant human Insulin-like growth factor
ROS	Reactive oxygen species
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
RXRα	Retinoid X receptor alpha
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SHC	SH2 domain protein
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog 1
SP-1	Specifity protein 1

SP-3	Specifity protein 3
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
SSAT2	Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase 2
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAD	Transactivation domain
TBE	Tris/Borate/EDTA
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
VEGFD	Vascular endothelial growth factor D
VHL	Von Hippel–Lindau tumor suppressor
WST	Water soluble Tetrazolium salt

Kurzzusammenfassung

Der Zahnhalteapparat ist verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Neben dem Stress durch mechanische Belastung als Folge von physiologischen Prozessen (z.B. Mastikation, Okklusion) bzw. zahnärztlichen Behandlungen (z.B. kieferorthopädische Zahnbewegung), spielen vor allem inflammatorische und hypoxische Reize eine große Rolle. Das den Zahn verankernde Bindegewebe (parodontales Ligament, PDL) zwischen Zahn und Knochen kann wichtige Funktionen hinsichtlich Druckverteilung und Regeneration von Defekten ausüben.

In dieser Arbeit wurde überprüft, welchen Einfluss der Wachstumsfaktor IGF1 auf PDL-Zellen hat, wenn diese inflammatorischen (IL-1 β) und hypoxischen (0,5 % O₂) Verhältnissen ausgesetzt sind. Aufgrund der allgemein bekannten IGF1-Effekte, wie z.B. Hemmung der Apoptose, Förderung von Proliferation, aber auch Differenzierung, könnte eine therapeutische Anwendung von IGF1 bei entzündlichen Erkrankungen des Zahnhalteapparates in Frage kommen. Die PDL-Zellen wurden hinsichtlich ihrer basalen Genexpression und ihres Sauerstoffverbrauchs charakterisiert. Es wurde der Einfluss von IGF1 auf die Proliferation, die Differenzierung und die differentielle Expression verschiedener Gene untersucht. Hierfür wurden Gene ausgewählt, welche bei der Regulation von Prozessen wie Angiogenese, Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung bzw. -aktivierung eine Rolle spielen. Außerdem wurde die mRNA-Expression von Komponenten des IGF-Systems unter den verschiedenen Bedingungen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass PDL-Zellen einen sehr geringen Sauerstoffbedarf haben. IL-1 β führte zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch. Hypoxie mit 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas förderte die Proliferation der Zellen. IL-1 β hingegen hemmte die Proliferation. IGF1 hatte auf die angeführten Effekte nur geringen positiven bis keinen Einfluss. In einem *in-vitro*-Wundheilungsmodell hingegen konnte IGF1 den hemmenden Effekt von IL-1 β umkehren. Aufgrund des schwachen Einflusses von IGF1 auf den IL-1 β -Effekt hinsichtlich der Proliferation, könnte der Wundverschluss durch eine erhöhte Migration der Zellen unter zusätzlichem IGF1 begünstigt sein. Unter entzündlichen und hypoxischen Bedingungen, zur Simulation einer Parodontitis, wurden Gene reguliert, welche zur Begünstigung von Angiogenese, Lymphangiogenese, Osteoklastenaktivierung, zur Hemmung der Osteoblastenfunktion, zum Integritätsverlust des PDLs, sowie zu Zerstörung der

extrazellulären Matrix beitragen können. Die beobachteten Einflüsse von IGF1 auf die Transkription einiger der untersuchten Gene könnten zur Hemmung des Knochenabbaus und zu einer Milderung der Entzündungsreaktion verhelfen. Um diese Beobachtungen zu verifizieren, müssen weitere Versuche auf Proteinebene folgen.

Abstract

The tooth supporting apparatus is exposed to various stress factors. In addition to mechanical stress as a consequence of physiological processes (e.g. mastication, occlusion) respectively dental treatments (e.g. orthodontic tooth movement), especially inflammatory and hypoxic stimuli are relevant stressors (e.g. gingivitis, periodontitis). The tooth-anchoring connective tissue (periodontal ligament, PDL) located between tooth and alveolar bone can administrate important functions concerning pressure balancing and regeneration of defects.

In this work it was tested, how IGF1 influenced PDL cells when these were exposed to inflammatory (IL-1 β) and hypoxic (0.5 % O₂) conditions. Due to the fact that IGF1 can inhibit apoptosis, advance proliferation, but also differentiation, the therapeutic application of IGF1 could come into consideration for treating inflammatory diseases of the tooth supporting apparatus. PDL cells were characterized concerning their basic gene expression and oxygen consumption. The influence of IGF1 on proliferation, differentiation and differential expression of various genes involved in processes like angiogenesis, osteoblastic and osteoclastic differentiation respectively activation were analyzed. Furthermore, the mRNA expression of IGF system components was investigated.

PDL cells were shown to have a low oxygen demand. Additionally, IL-1 β reduced oxygen consumption. Hypoxia with 0.5 % O₂ in the incubation gas increased proliferation. However, IL-1 β inhibited proliferation. IGF1 hardly influenced the effects of IL-1 β mentioned above. In contrast, IGF1 could reverse the negative impact of IL-1 β in an *in-vitro* wound healing model. Due to the weak IGF1 influence on the IL-1 β effect concerning proliferation, wound closure could be supported by increased migration of the PDL cells under additional IGF1. Inflammatory and hypoxic conditions led to the regulation of genes that support angiogenesis, lymph angiogenesis, osteoclast activation, inhibition of osteoblast function, loss of integrity of the PDL as well as degradation of extracellular matrix. However, observed influences of IGF1 on the transcription of a few investigated genes could contribute to the mitigation of IL-1 β -induced bone destruction as well as inflammatory reaction.

Further investigations are necessary to resolve, how far IGF1 affects the translation of studied mRNAs or post-translational modification on protein level.

1 Einleitung

Biologische Systeme sind vielen verschiedenen äußeren Einflüssen ausgesetzt. Treten Änderungen der Bedingungen im Umfeld von Organismen und Zellen auf, so entstehen Stresssituationen, die bewältigt werden müssen. Exogene (z.B. Nähr- und/oder Sauerstoffmangel, toxische Substanzen, Bestrahlung, Entzündung), aber auch endogene Stressfaktoren (z.B. ROS) können biologische Makromoleküle (Lipide, Nukleinsäuren, Proteine, Polysaccharide) und Zellorganellen (z.B. Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus, Mitochondrien, Lysosomen) schädigen (Simmons et al., 2009). Metazoen besitzen daher diverse intrazelluläre Signalsysteme, um solche Schäden zu reparieren und die Homöostase der Zellen unter solchen Situationen aufrechtzuerhalten oder wiederherzustellen. Sind die Stressoren zu intensiv oder zu lange präsent, so folgen apoptotische oder nekrotische Reaktionen, um irreversibel geschädigte Zellen zu beseitigen (Kültz, 2005). Typische Stressreaktionen auf zellulärer Ebene sind z.B. Proliferation, Apoptose, Differenzierung oder Umstellung des Metabolismus.

Auch der Zahnhalteapparat ist verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Neben dem Stress durch mechanische Belastung als Folge von physiologischen Prozessen (z.B. Mastikation, Okklusion) bzw. zahnärztlichen Behandlungen (z.B. kieferorthopädische Zahnbewegung), spielen vor allem inflammatorische und hypoxische Reize eine große Rolle (McCulloch et al., 2000).

1.1 Der Zahnhalteapparat

Der Zahnhalteapparat (Parodontium) ist das funktionelle Verankerungssystem des Zahnes. Der Zahnhalteapparat besteht aus vier Hart- und Weichgeweben, zu denen das Wurzelzement, der Alveolarknochen, das parodontale Ligament (PDL, Wurzelhaut oder Desmodont) und die Gingiva (marginales Parodont, Zahnfleisch) zählen (**Abb. 1**) (Schroeder, 2000; Radlanski, 2011). Zahnstellungsänderungen und die Reparatur von traumatischen Schädigungen werden durch dieses System ermöglicht (Schroeder, 2000; Radlanski, 2011). Die von PDL-Fibroblasten produzierten kollagenen Faserbündel und Oxytalanfasern sorgen für die

Verankerung des Zahnes bei gleichzeitig begrenzter Flexibilität. Die Fasern strahlen in das Zahnzement und in die Knochengrundsubstanz des Alveolarknochens ein und werden dort mineralisiert (Fullmer et al., 1974; Schroeder, 2000; Radlanski, 2011). Diese mineralisierten Faseranteile in Knochen und Zement werden Sharpey-Fasern genannt. Der Zahn ist damit im Zahnfach aufgehängt und bekommt bei mechanischer Belastung (z.B. Mastikation oder kieferorthopädische Behandlung) keinen direkten Kontakt zum Knochen. Diese Struktur der Verkeilung von Zahn in Knochen mit gleichzeitiger Verbindung und Stabilisierung durch Bindegewebsfasern nennt man auch Gomphosis.

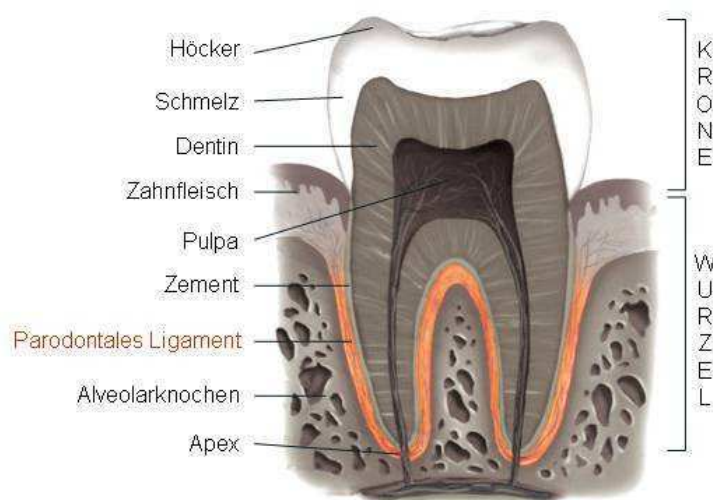


Abb. 1: Anatomie von Zahn und Zahnhalteapparat

(Quelle: http://www.studiodentaire.com/en/glossary/periodontal_ligament.php [Mai 2011]; mod.).

Zum Zahnhalteapparat gehören Zahnfleisch (Gingiva), Zement, parodontales Ligament (PDL) und Alveolarknochen.

1.2 Das parodontale Ligament

Das parodontale Ligament ist ein Bindegewebe, welches einen ca. 0,15 bis 0,38 mm breiten Raum zwischen Zahnwurzel und Alveolarknochen auskleidet. Dieser sogenannte Parodontalspalt wird mit zunehmendem Alter und/oder fehlender Belastung schmaler. Ein wichtiger Bestandteil sind die bereits oben genannten kollagenen Fasern (**Abb. 2**), welche einem ständigen, kontrollierten Ab- und Wiederaufbau durch Fibroblasten unterliegen (Schroeder, 2000; Radlanski, 2011).

Druckkräfte auf den Zahn führen zu einer Dehnung der Fasern, so dass Zugkräfte entstehen, welche auf den Knochen übertragen werden. Zugkräfte führen zur Stimulation des Knochenaufbaus. Fehlt die Belastung, oder treten Druckkräfte auf den Knochen auf, erfolgt ein Knochenabbau (Melsen, 2001; Henneman et al., 2008). Dieses lässt sich besonders bei kieferorthopädischen Behandlungen beobachten, bei denen durch dauerhafte Krafteinwirkung Zähne bewegt werden. Bei der körperlichen Bewegung von Zähnen treten Zug- und Druckkräfte auf. Dies führt auf der Zugseite zu einer Apposition von Knochen, während in Richtung der Zahnbewegung (Druckseite) eine Resorption des Knochens erfolgt.

Außer dem starken faserreichen Anteil hat das PDL auch einen zellulären Anteil. Dieser besteht aus einer sehr heterogenen Zellpopulation, welche sich aus Fibroblasten, Osteo- und Zementoprogenitorzellen, Osteo- und Zementoblasten, Osteoklasten, epithelialen Zellresten (Malassez'sche Epithelreste) und Leukozyten (z.B. Lymphozyten, Makrophagen) zusammensetzt (Schroeder, 2000; Nanci and Bosshardt, 2006; Radlanski, 2011). Fibroblasten stellen den zahlenmäßig größten zellulären Anteil dar und sind entlang der Fasern angeordnet (Osborn, 1981; Nanci and Bosshardt, 2006). Progenitorzellen sind ausschließlich in zement- bzw. knochennahen Bereichen des PDLs zu finden. Knochen und Zement modellierende Zellen treten nur in Phasen auf, in denen Umbaumaßnahmen stattfinden.

Aus PDL-Gewebe gewonnene PDL-Zellen zeigen in Kultur eine Fibroblasten-artige Morphologie und sezernieren verschiedene Kollagene. Im Vergleich mit gingivalen Fibroblasten produzieren PDL-Zellen deutlich höhere Mengen an Protein und zeigen eine hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Somerman et al., 1988). Die hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Expression von Knochen-assoziierten Proteinen zeigen, dass die PDL-Zellen auch Osteoblasten-ähnliche Eigenschaften besitzen (Jönsson et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass PDL-Zellen unter bestimmten Bedingungen zu Osteoblasten und Zementoblasten differenzieren können (Basdra and Komposch, 1997; Lossdörfer et al., 2011). Weiterhin können sie zur Osteoklastenaktivierung beitragen. Neuere Studien zeigen, dass es im PDL multipotente Progenitorzellen gibt, die z.B. zu Osteoblasten, Zementoblasten, und Adipozyten differenzieren können (Park et al., 2011; Wang et al., 2011). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass PDL-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen immunmodulatorische Funktionen übernehmen (z.B. Expression von Zytokinen)

(Ohyama et al., 2002; Jönsson et al., 2011). Das PDL kann aufgrund des Differenzierungspotenzials seiner Zellen, Umbauprozesse und Regeneration des Zahnhalteapparats bis zu einem gewissen Grad fördern (Schroeder, 2000; Radlanski, 2011).

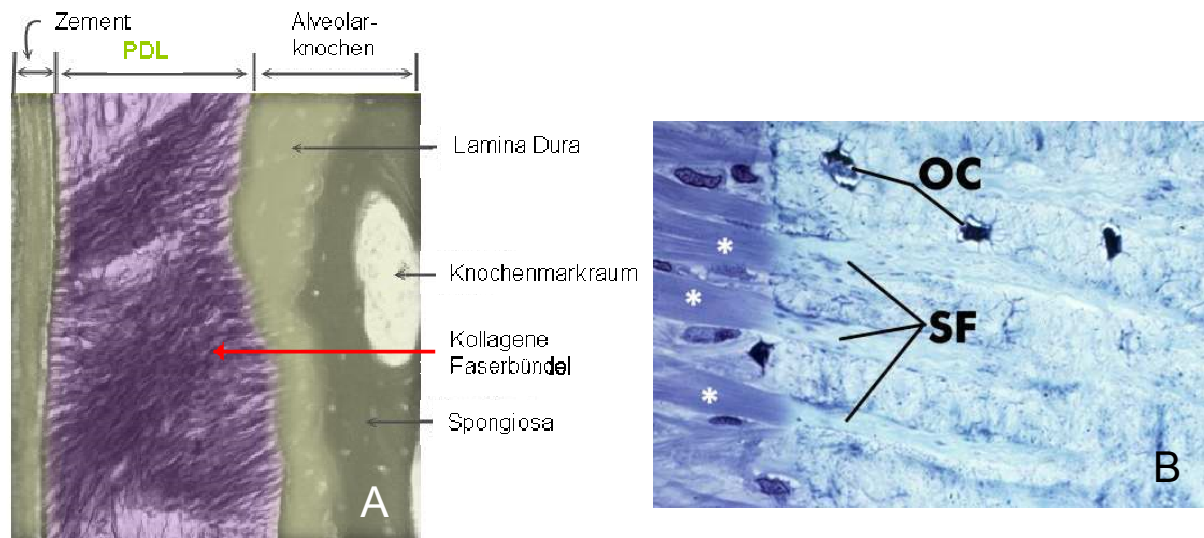


Abb. 2: Darstellung des Faserapparates im PDL

(A) kollagene Faserbündel verbinden Zement des Zahnes mit dem Knochen

(Quelle: http://www.doctorspiller.com/images/Tooth_Anatomy/PDL.jpg [Mai 2011]; mod.)

(B) die Enden der Faserbündel inserieren in den Knochen und werden mineralisiert (Sharpey-Fasern, SF); OC – Osteozyten; * nicht mineralisierte Faserteile;

(Quelle: http://www.dental.pitt.edu/informatics/periopathology/de/PDL_images/histo78a2.htm [Mai 2011])

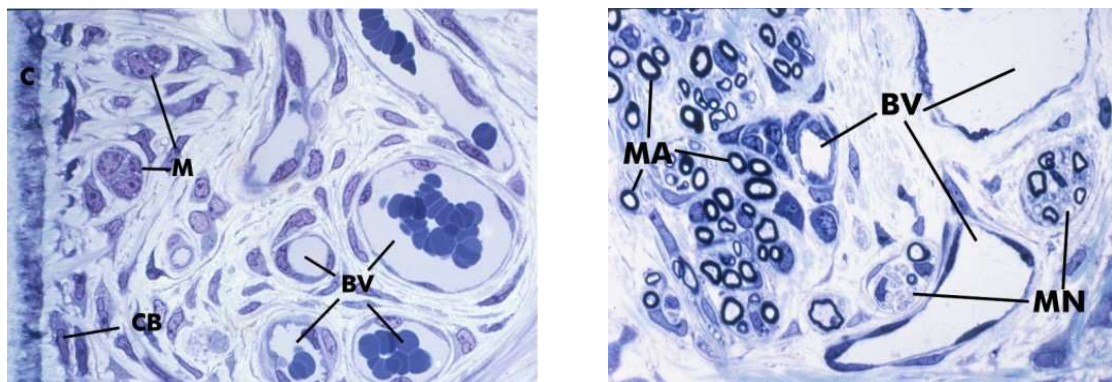


Abb. 3: Histologische Querschnitte des PDLs

(Quelle: <http://www.dental.pitt.edu/informatics/periopathology/de/gu0405.htm> [Mai 2011])

CB – Zementoblasten, M – Mallasez'sche Epithelreste, BV – Blutgefäße, MA – myelinisierte Axone, MN – nicht-myelinisierte Axone

Im PDL befinden sich viele Blut- und Lymphgefäße (**Abb. 3**). Die Hauptversorgung mit Blut geschieht über Blutgefäße, die aus dem Alveolarknochen ins PDL ragen. Aber auch gingivale und apikale Blutgefäße tragen zur Versorgung bei (Schroeder, 1986; Tsukada et al., 2000; Masset et al., 2006). Bei pathologischen Belastungszuständen kann es vorkommen, dass Gefäße abgedrückt werden und somit der Blutfluss gestört ist (Ischämie). Das PDL hat zusätzlich auch eine sensorische Funktion. Es ist großzügig mit Nervenenden versorgt (**Abb. 3**), die empfindlich auf verschiedene Stimuli (z.B. Kälte, Hitze, Druck) reagieren (Schroeder, 2000; Huang et al., 2011b; Radlanski, 2011).

Neben mechanischen Kräften, (physiologisch und pathologisch), üben vor allem Entzündungsreaktionen in Form von parodontalen Erkrankungen einen starken Einfluss auf das PDL aus.

1.3 Parodontale Erkrankungen

Parodontale Erkrankungen sind eine heterogene Gruppe inflammatorischer Erkrankungen, die allgemein als Gingivitis (Zahnfleischentzündung) oder als Parodontitis eingruppiert werden können (**Abb. 4**). Eine Klassifizierung dieser Erkrankungen wurde 1999 entwickelt (Armitage, 1999). Seltene Formen von Parodontalerkrankungen sind u.a. die nekrotisierende ulzerative Gingivitis und die nekrotisierende ulzerative Parodontitis sowie parodontale Abszesse (Kinane and Mark Bartold, 2007; Kwar et al., 2011).



Abb. 4: Parodontale Erkrankungen (Quelle: Deutsche Gesellschaft für Parodontologie, DGP)

Links – gesundes Zahnfleisch, füllt die Zwischenräume gut aus, blutet bei Berührung nicht, belagfreie Zähne; Mitte – Gingivitis, gerötetes und geschwollenes Zahnfleisch blutet leicht bei Berührung, mit bakteriellen, verfärbten Belägen behaftete Zähne; Rechts – Parodontitis, gerötetes, teilweise geschwollenes und zurückgewichenenes Zahnfleisch, lockere Zähne mit teilweise fehlendem knöchernen Unterbau

Parodontale Erkrankungen entstehen durch Langzeiteinwirkung von bakteriellen Biofilmen (Plaque), welche aus Bakterien, Speichel und Nahrungsresten bestehen. Verschiedene Cluster von bakteriellen Spezies bevölkern gemeinsam den subgingivalen Raum und sind reproduzierbar mit parodontalen Erkrankungen assoziiert (Socransky et al., 1998; Sanz and van Winkelhoff, 2011). Bakterien, die von ihnen produzierten Toxine (z.B. Leukotoxine), Kollagenasen, Fibrinolysine und andere Proteasen sorgen für eine immunologische Reaktion durch den Wirtsorganismus (Socransky and Haffajee, 1994; Berezow and Darveau, 2011; Graves et al., 2011).

Es kommt zu einer Entzündung der Gingiva (Gingivitis), welche durch die klassischen Entzündungszeichen – Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor), Überwärmung (Calor), Schmerz (Dolor) und eingeschränkte Funktion (functio laesa) des Epithels – gekennzeichnet ist.

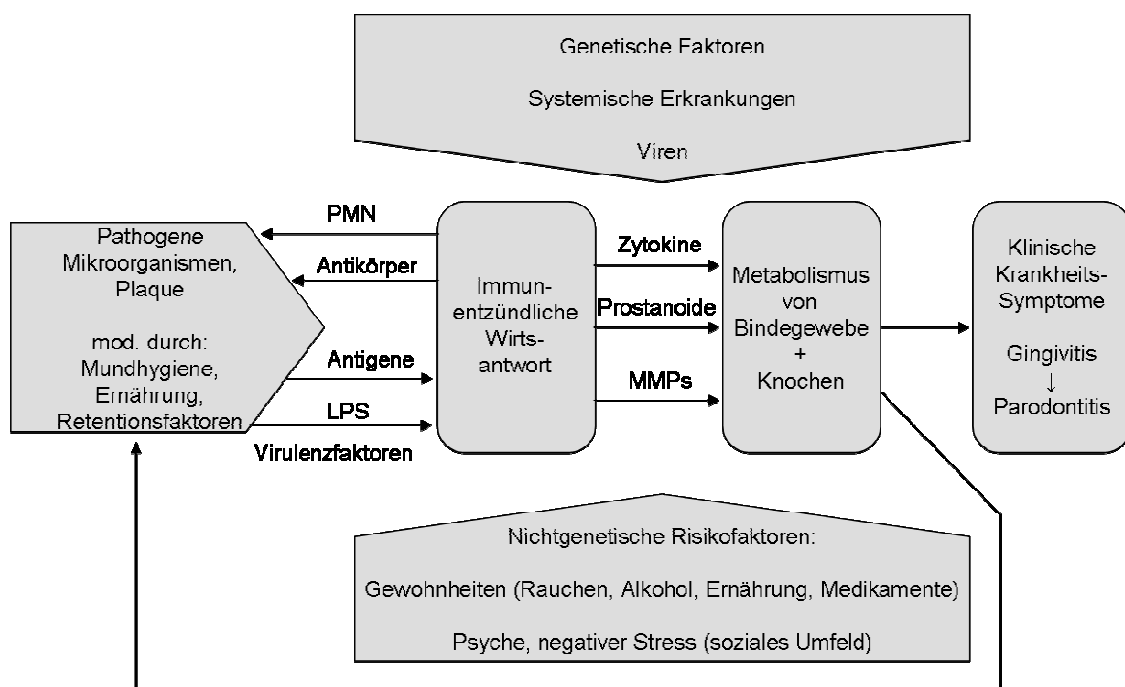


Abb. 5: Entstehung einer Parodontitis [modifiziert nach (Page and Kornman, 1997)]

Der bakterielle Biofilm (Plaque) löst eine Immunantwort durch den Wirt aus, welche nicht nur die Mikroorganismen angreift, sondern auch auf das umliegende Gewebe schädigende Einflüsse ausübt. Die Intensität und Wirksamkeit der Wirtsantwort hängt von vielen Faktoren ab. Dieses Zusammenspiel von Angriff und Abwehr führt zur Ausprägung der Krankheitssymptome einer Gingivitis, welche unbehandelt in eine Parodontitis übergehen kann, aber nicht muss. PMN – Polymorphkernige Leukozyten, LPS – Lipopolysaccharide, MMPs – Matrix-Metalloproteasen

Eine chronische Exposition mit bakteriellen Biofilmen ist zwar die Ursache parodontaler Erkrankungen, aber ein entscheidender Faktor für deren Verlauf und Progression ist die Immunantwort des betroffenen Individuums (Garlet, 2010; Deo and Bhongade, 2010). Diese ist von verschiedenen Risikofaktoren abhängig (**Abb. 5**). Hierbei spielen individuelles Verhalten und Lebensstil (z.B. Tabak- und Alkoholkonsum, Mangelernährung, Stress, Hygiene), genetische Veranlagung (z.B. bei Papillon-Lefèvre-, Chédiak-Higashi-, Ehlers-Danlos-, Kindlers- und Cohen-Syndrom, Variationen in Zytokingenen), Systemerkrankungen (z.B. HIV/AIDS, Osteoporose, Diabetes) und eine gestörte Wirtsantwort eine Rolle (Pihlstrom et al., 2005). Die Immunantwort des Wirts ist normalerweise protektiv wirksam. Eine zu schwache, aber auch eine überschießende Immunantwort können allerdings zu fortschreitender Gewebeerstörung beitragen (Preshaw et al., 2004).

Etwa 80 % der Erwachsenen in Deutschland sind von mittelschweren bis schweren parodontalen Erkrankungen betroffen (Hoffmann et al., 2006). Wird eine bakteriell induzierte Zahnfleischentzündung nicht oder zu spät behandelt, so kann die Entzündung auf den restlichen Zahnhalteapparat (PDL, Knochen, Zement) übergehen, so dass eine Parodontitis entsteht.

1.3.1 Parodontitis

Die Zusammensetzung des Biofilms verändert sich kontinuierlich von vorwiegend Gram-positiven aeroben zu vorwiegend Gram-negativen anaeroben Bakterien (Berezow and Darveau, 2011). Durch die Immunantwort werden Proteasen gebildet bzw. aktiviert, welche die extrazelluläre Matrix und Kollagenfasern abbauen (Pihlstrom et al., 2005). Dies führt zur Bildung von Taschen zwischen Zahnfleisch und Zahn, welche immer tiefer werden, so dass sich der Biofilm immer weiter Richtung Wurzelspitze ausbreiten kann. Wenn die fortschreitende Entzündung auf den Knochen übergeht, erfolgt dessen Abbau (Bartold and Narayanan, 2006). Durch den Verlust von Bindegewebe und Knochen kommt es schließlich zu einer Lockerung des Zahnes, was bis hin zum Verlust des Zahnes führen kann.

Je nach Art der beteiligten Bakterien und vorliegenden Risikofaktoren kann die Parodontitis in zwei prinzipiell unterschiedlichen Verläufen beobachtet werden. Auf der einen Seite gibt es die chronische Parodontitis, auf der anderen die akute,

aggressive Parodontitis (Kinane and Mark Bartold, 2007). Die chronische Parodontitis verläuft schubweise, über sehr lange Zeiträume. Dieser Verlauf tritt vorwiegend bei Erwachsenen auf und ist gewöhnlich schmerzfrei. Bei der aggressiven Parodontitis (frühe juvenile Parodontitis) erfolgt ein besonders schneller und umfangreicher Verlust an Knochensubstanz (Rescala et al., 2010). Diese Form der Parodontitis kann schon im Kindesalter auftreten. Im Falle einer aggressiven Parodontitis können eine vermehrte Zahl an T-Zellen, aber eine verminderte Anzahl Makrophagen im Vergleich mit einer chronischen Parodontitis nachgewiesen werden (Lappin et al., 1999; Kinane and Mark Bartold, 2007).

Parodontitis stellt eine echte Volkskrankheit dar. Epidemiologische Untersuchungen im Rahmen der IV. Deutschen Mundgesundheitsstudie zeigten, dass zum Zeitpunkt der Studie über 50 Prozent der 35- bis 44-Jährigen in Deutschland eine mittelschwere, etwa 20 Prozent sogar eine schwere Parodontitis hatten. Weiter steigende Zahlen sind zu erwarten, da durch besser werdende Mundgesundheit Zähne länger erhalten bleiben und mit zunehmendem Alter einem erhöhten Risiko für Parodontitis ausgesetzt sind (Hoffmann et al., 2006). Mit einer Parodontitis ist oftmals eine verminderte Allgemeingesundheit assoziiert. Auch ein Zusammenhang parodontaler Erkrankungen mit Gefäßerkrankungen (v.a. Arteriosklerose) wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Pessoa et al., 2011). Dies kann in der Folge wiederum zu Herzinfarkt und Schlaganfall führen. Außerdem trägt eine unbehandelte Parodontitis zu erhöhten Wahrscheinlichkeiten für Diabetes und Risikoschwangerschaften bei (Pihlstrom et al., 2005; Deschner and Jepsen, 2011).

Entzündliche Bedingungen, wie z.B. bei einer Parodontitis, sind meist eng mit Hypoxie assoziiert. Einerseits kann Hypoxie pro-inflammatorische Zytokine positiv regulieren, so dass eine Entzündung entsteht (Cummins and Taylor, 2005). Auf der anderen Seite können bei Entzündung ein hoher metabolischer Bedarf der einwandernden Immunzellen und eine bakterielle Infektion zur Hypoxie beitragen. Auch die schnell proliferierenden Mikroorganismen können den verfügbaren Sauerstoff rasch entziehen, so dass hypoxische Bedingungen entstehen (Eltzschig and Carmeliet, 2011). Hypoxie und die damit verbundene Aktivierung Hypoxie-induzierbarer Faktoren (HIFs) wurde in Gewebeproben von Patienten mit anderen entzündlichen Bedingungen, wie z.B. Arthritis, Artherosklerose und

Autoimmunerkrankungen beobachtet (Nizet and Johnson, 2009; Majmundar et al., 2010). Hypoxische Zustände können im PDL außerdem durch Diabetes, Rauchen, Trauma oder während der Wundheilung in Form einer Ischämie hervorgerufen werden (Bartold and Narayanan, 2006; Motohira et al., 2007). Auch in entzündeten parodontalen Geweben (z.B. PDL) wurden HIFs und deren Aktivierung nachgewiesen. Es zeigte sich eine verstärkte HIF-Aktivierung unter gleichzeitigem psychologischen Stress bei Ratten (Huang et al., 2011a).

1.4 Hypoxie

Als Hypoxie wird ein Zustand bezeichnet, bei dem der Sauerstoffpartialdruck deutlich unter dem normaler atmosphärischer Bedingungen (Normoxie) liegt. Wenn der Bedarf an molekularem Sauerstoff zur Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen das vaskuläre Angebot übersteigt, entsteht eine Hypoxie. Die Zellen verbrauchen dann mehr Sauerstoff, als zur Verfügung steht. Es können je nach Gewebetyp verschieden schwere Hypoxiegrade auftreten. Der Energiebedarf und die vorhandene Vaskularisierung eines Gewebes spielen dabei eine entscheidende Rolle (Brahimi-Horn et al., 2007). Gewebhypoxie tritt unter pathophysiologischen Bedingungen, aber auch bei diversen physiologischen Prozessen (z.B. Wachstum, Embryonalentwicklung) auf. In pathophysiologischer Hinsicht sind vor allem vaskuläre Erkrankungen, chronische Entzündungen und Tumorerkrankungen zu nennen (Cummins and Taylor, 2005; Hansen et al., 2011). Da molekularer Sauerstoff die primäre Quelle metabolischer Energie in allen aeroben Organismen ist, haben sich im Laufe der Evolution Anpassungsmechanismen entwickelt. In Folge einer Unterversorgung mit Sauerstoff werden zahlreiche Gene hochreguliert, deren Produkte die Perfusion des Gewebes (Angiogenese), die Erythropoese und die anaerobe ATP-Generierung durch die Glykolyse fördern (Bunn and Poyton, 1996; Czyzyk-Krzeska, 1997; Nakayama, 2009).

Wichtige Faktoren, welche die durch Hypoxie vermittelten Anpassungsprozesse steuern, sind drei bisher bekannte Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIFs), HIF-1, HIF-2 und HIF-3 (Majmundar et al., 2010; Lu and Kang, 2010). Der am besten untersuchte Faktor ist das ubiquitär exprimierte HIF-1, welches als Hauptregulator der hypoxischen Signalübertragung verstanden wird (Semenza, 2004). HIF-2 und

HIF-3 werden selektiv in einzelnen Geweben bzw. Zellen (z.B. vaskuläre Endothelzellen) exprimiert (Majmundar et al., 2010). Außer HIFs werden zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren (u.a. NFκB, CREB, AP-1, p53, SP-1 und SP-3) durch Hypoxie beeinflusst (Cummins and Taylor, 2005). Im Folgenden soll auf HIF-1 näher eingegangen werden.

1.4.1 Struktur und Regulation von HIF-1

1.4.1.1 Struktur

HIF-1 ist ein Heterodimer, welches sich aus einer konstitutiv exprimierten HIF-1β-Untereinheit (auch: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) und einer O₂-regulierten HIF-1α-Untereinheit zusammensetzt (Wang et al., 1995b). Beide Untereinheiten gehören zur PAS-Familie (Proteine mit Per-ARNT-Sim-homologen Domänen) und sind mit einem Helix-loop-Helix-Motiv ausgestattet (**Abb. 6**) (Wang et al., 1995b; Majmundar et al., 2010). Über diese Motive wird die Heterodimerisierung und die Bindung an die DNA vermittelt. Weitere, für die posttranslationalen Modifikationen bzw. Funktionalität von HIF-1α, wichtige Domänen sind die ODD-Domäne (Oxygen dependend degradation domain) und zwei Transaktivierungsdomänen sowie eine Sequenz zur Translokation in den Zellkern (Nuclear localization sequence, NLS) (**Abb. 6**). Die ODD-Domäne erlaubt die Sauerstoff-abhängige Regulation (Pugh et al., 1997; Huang et al., 1998). Die Transaktivierungsdomänen (N-TAD und C-TAD), von denen die N-terminale in der ODD-Domäne liegt und die zweite am C-terminalen Ende von HIF-1α, sind von entscheidender Bedeutung bei der Bindung von Co-Aktivatoren (z.B. p300/CBP), durch welche die transkriptionelle Aktivität erhöht wird (Kallio et al., 1998; Otrrock et al., 2009). Außerdem finden in diesen Regionen verschiedene posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Hydroxylierung, Phosphorylierung, Acetylierung und/oder Redoxmodifikationen statt (Bruick and McKnight, 2001; Richard et al., 1999; Aragonés et al., 2001; Huang et al., 1996; Jeong et al., 2002).

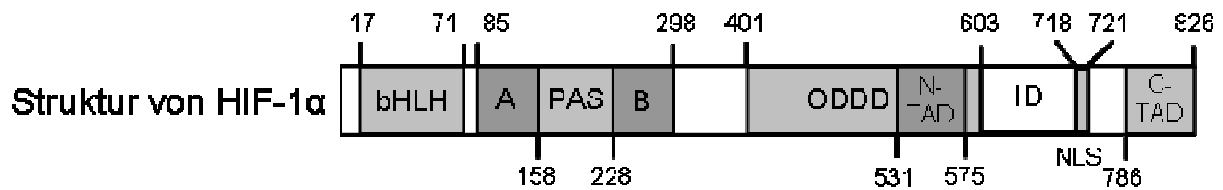


Abb. 6: Struktur des HIF-1 α -Proteins

Das Protein besitzt eine Helix-Loop-Helix (bHLH)-Struktur sowie eine Per-ARNT-Sim-Domäne (PAS), welche in zwei Subdomänen unterteilt ist (A, B). In der C-terminalen Region befinden sich 2 Transaktivierungsdomänen (N-TAD, C-TAD) mit zwischenliegender Inhibitor-Domäne (ID) und ein Signal für die Translokation in den Zellkern (NLS). Außerdem gibt es eine Domäne zur Sauerstoff-abhängigen Regulation (ODDD, oxygen-dependent degradation domain). (Chun et al., 2002).

1.4.1.2 Sauerstoff-abhängige Regulation

Die HIF-1 α -Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich synthetisiert, dann aber einer Hydroxylierung an den Prolinresten 402 und/oder 564 durch Proteine mit einer Prolylhydroxylase-Domäne (PHDs) unterzogen. Die Hydroxylierung an Prolinresten erfolgt an HIF-1 α hauptsächlich durch das Prolylhydroxylasedomäne-enthaltende Protein 2 (PHD2) in der ODD-Domäne (Berra et al., 2003). Durch diese Prolin-Hydroxylierungen wird die Bindung des von Hippel-Lindau-Proteins (VHL) ermöglicht. Dieses wiederum interagiert mit Elongin C und rekrutiert dadurch einen Ubiquitin-Ligase-Komplex (Kamura et al., 2000; Kaelin and Ratcliffe, 2008). Ein weiteres Protein (SSAT2) interagiert mit HIF-1 α , VHL und Elongin C, stabilisiert dadurch die Verbindung von VHL und Elongin C und erleichtert somit die Ubiquitinierung (Baek et al., 2007). Die Ubiquitinierung markiert HIF-1 α für die Degradierung durch Proteasomen (Salceda and Caro, 1997).

Eine weitere Hydroxylierungsreaktion findet am Asparaginrest 803 statt. Sie wird durch einen Sauerstoff-abhängigen, HIF-inhibierenden Faktor (factor inhibiting HIF-1, FIH-1) vermittelt (Mahon et al., 2001). Durch diese Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung wird die Interaktion der Transaktivierungs-Domäne mit dem Co-Aktivator p300/CBP verhindert (Peet and Linke, 2006). Bei den Prolin- als auch den Asparagin-Hydroxylierungen werden jeweils O₂ und α -Ketoglutarat als Substrate verwendet, so dass als Nebenprodukte CO₂ und Succinat entstehen (Chowdhury et al., 2008; Kaelin and Ratcliffe, 2008). Durch niedrige Sauerstoffkonzentration (Hypoxie), hohe Konzentrationen an Zwischenprodukten des Tri-Karbonsäure-Zyklus

(Isocitrat, Oxalacetat, Succinat oder Fumarat) oder Fe(II)-Chelatoren wird die Aktivität der Hydroxylasen inhibiert (Semenza, 2007; Majmundar et al., 2010). Auch eine verstärkte mitochondriale Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hat eine inhibierende Wirkung. Diese ROS können die Hydroxylasen durch die Oxidation des Eisens im katalytischen Zentrum der Enzyme inaktivieren (Guzy and Schumacker, 2006; Kaelin and Ratcliffe, 2008).

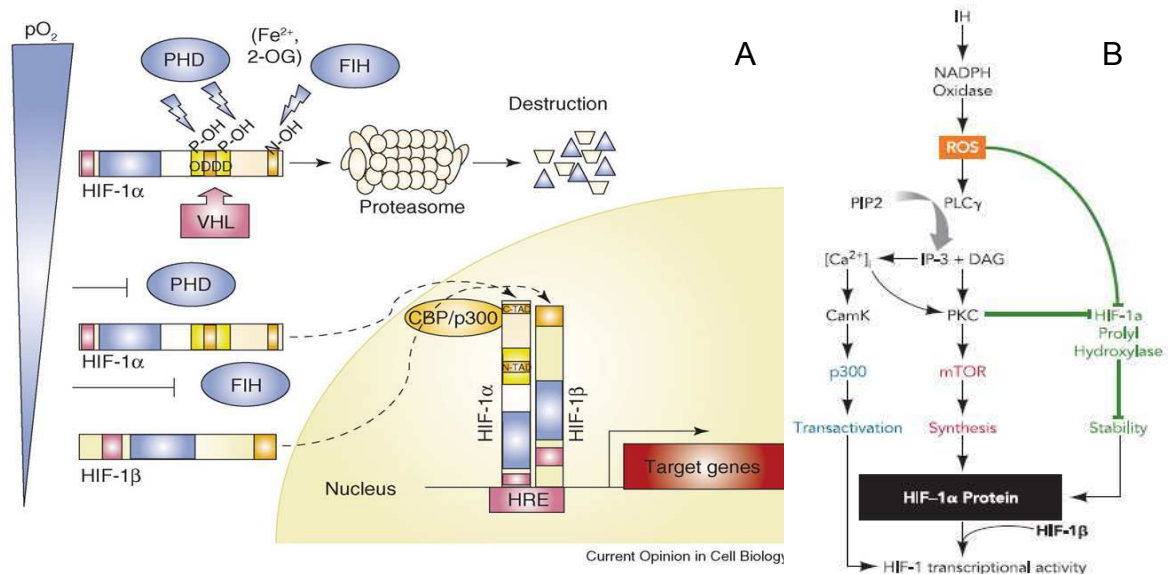


Abb. 7: HIF-1α-Regulation unter chronischer (A) und intermittierender Hypoxie (B)

(A) HIF-1α wird unter normoxischen Bedingungen durch Fe²⁺ - und Sauerstoff-abhängige Prolylhydroxylasen (PHD) und den HIF-inhibierenden Faktor (FIH) hydroxyliert und somit zugänglich für das von Hippel-Lindau-Protein (VHL), welches im Zusammenspiel mit weiteren Adapterproteinen die Degradierung vorbereitet. Unter chronischer Hypoxie sind die Hydroxylasen nicht aktiv. HIF-1α wird dadurch stabilisiert und kann in den Zellkern transportiert werden, wo es als Dimer mit HIF-1β an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) binden kann. Durch Co-Aktivatoren, wie das CREB-bindende Protein und p300, wird die Transkription zahlreicher Gene gefördert. (Brahimi-Horn et al., 2007).

(B) Unter intermittierender Hypoxie kommt es über die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) zur Inaktivierung der Hydroxylasen (HIF-1α-Stabilität ↑), zur gesteigerten HIF-1α-Proteinsynthese und zur gesteigerten Transaktivierung durch p300. (Semenza, 2009).

Bei einer intermittierenden Hypoxie, bei der sich Perioden von 15 bis 30 sec Hypoxie mit längeren Reoxygenierungszeiten abwechseln, werden andere Mechanismen zur Regulierung von HIF-1α genutzt (Yuan et al., 2008). Hierbei erfolgt über eine verstärkte Bildung von ROS durch die NADPH-Oxidase eine Hemmung der Prolyl-Hydroxylasen sowie eine Aktivierung der Phospholipase Cγ (PLCγ). Diese führt zur Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃). IP₃ sorgt für die Freisetzung von

intrazellulärem Ca^{2+} , welches zur Aktivierung der Calcium-Calmodulin-Kinase (CamK) beiträgt. Zusammen mit Diacylglycerol führt IP3 außerdem zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). PKC sorgt über eine zusätzliche Hemmung der Prolylhydroxylasen für eine erhöhte HIF-1 α -Stabilität und über den mTOR-Weg zur gesteigerten HIF-1 α -Proteinsynthese (Yuan et al., 2008). CamK sorgt weiterhin für die Phosphorylierung des Coaktivators p300, so dass insgesamt eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α vorliegt (Yuan et al., 2005). Eine vereinfachte Übersicht über die Sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 α ist in **Abbildung 7** dargestellt.

1.4.1.3 Sauerstoff-unabhängige Regulation

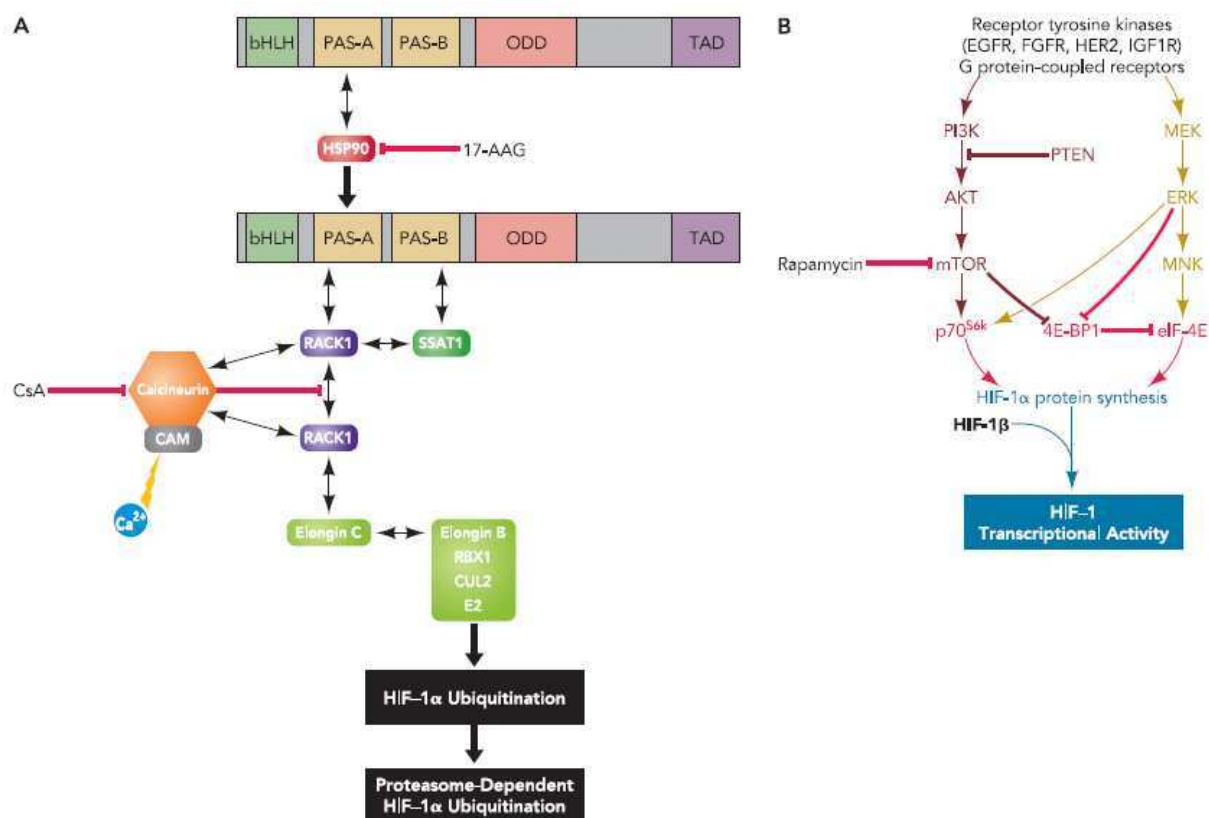


Abb. 8: Sauerstoff-unabhängige Regulation von HIF-1 α -Protein

(A) Stabilitätsregulation durch RACK1 und HSP90; Der Inhibitor von HSP90 (17-AAG, 17-Allylaminogeldanamycin) und der Calcineurininhibitor Cyclosporin A (CsA) fördern die Bindung von RACK1 und damit die Degradierung von HIF-1 α . (B) Verstärkung der transkriptionellen Aktivität; Äußere Signale fördern über den PI3K- und den MEK-Weg die Proteinsynthese von HIF-1 α . Die gebildete Proteinmenge wird nicht schnell genug degradiert, so dass HIF-1 α in den Kern gelangen und dort transkriptionell aktiv werden kann. (Semenza, 2009).

Außer der Degradierung von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen gibt es auch einen Abbaumechanismus, welcher unabhängig vom Sauerstoff wirkt. Hierbei spielt die kompetitive Bindung zweier Proteine eine entscheidende Rolle. Heat-Shock-Protein 90 (HSP90) hat eine stabilisierende Wirkung, während RACK1 (receptor of activated protein kinase C 1) durch seine Interaktion mit Elongin C für die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von HIF-1 α verantwortlich ist (Liu et al., 2007b).

Wenn HIF-1 α stabilisiert ist, kann es in den Nukleus transloziert werden, wo es mit HIF-1 β dimerisiert. Anschließend erfolgt die Bindung an spezielle DNA-Sequenzen, die sogenannten Hypoxie-responsiven Elemente (HREs, **Abb. 7, 8**). Diese Erkennungssequenz 5'-(A/G)CGTG-3' liegt in der Promotorregion zahlreicher Zielgene (Semenza et al., 1996; Semenza, 2009). Eine Bindung von HIF-1 führt zu einer Transkriptionssteigerung der betroffenen Gene.

Über extrazelluläre Stimulation mit Wachstumsfaktoren (z.B. IGFs), Zytokinen oder auch durch mechanische Belastung werden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, wie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)- und MAP-Kinase-Wegen. Diese Einschaltung sorgt für eine gesteigerte HIF-1 α -Proteinsynthese (Fukuda et al., 2002; Laughner et al., 2001; Treins et al., 2002; Zhong et al., 2000). Das ist nicht verwunderlich, da Wachstumsfaktoren und Zytokine zu einer gesteigerten Proliferation beitragen und bei Wachstumsprozessen leicht eine verminderte Versorgung mit Sauerstoff auftreten kann. **Abbildung 8** zeigt eine Übersicht über die Regulation von HIF-1 α in Anwesenheit von Sauerstoff.

Durch die Verknüpfung der intrazellulären Wachstumsfaktor-induzierten Signalwege mit den diversen Stress-induzierten Signalwegen, kann z.B. das IGF-System Einfluss auf diese nehmen (Kurmasheva and Houghton, 2006; Samani et al., 2007). Interaktionen zwischen IGF-System und Hypoxie werden hauptsächlich über den PI3K/Akt/mTOR- und den ERK1/2-Signalweg ermöglicht (Feng et al., 2005; Arsham and Neufeld, 2006; Kurmasheva and Houghton, 2006; Endo et al., 2007; Manning and Cantley, 2007). Auch inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , können über den PI3K-Weg, über die MAPK ERK, p38 und JNK mit dem IGF-System interagieren (Kurmasheva and Houghton, 2006; Li and Lin, 2008). IL-1 β spielt z.B. eine wichtige

Rolle bei der Pathogenese einer Parodontitis. Es sorgt für die Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) durch PDL-Fibroblasten. Außerdem werden Osteoklasten aktiviert und Knochen resorbiert (Bartold and Narayanan, 2006). Aufgrund der Schnittstellen von Stress-Signalwegen mit den IGF-Signalwegen scheint es interessant, sich das IGF-System anzuschauen. Wie wird die Expression von IGF-Systemkomponenten modifiziert und welchen Einfluss hat exogen zugeführtes IGF1 auf die Stressreaktionen?

1.5 Das Signalsystem der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-System)

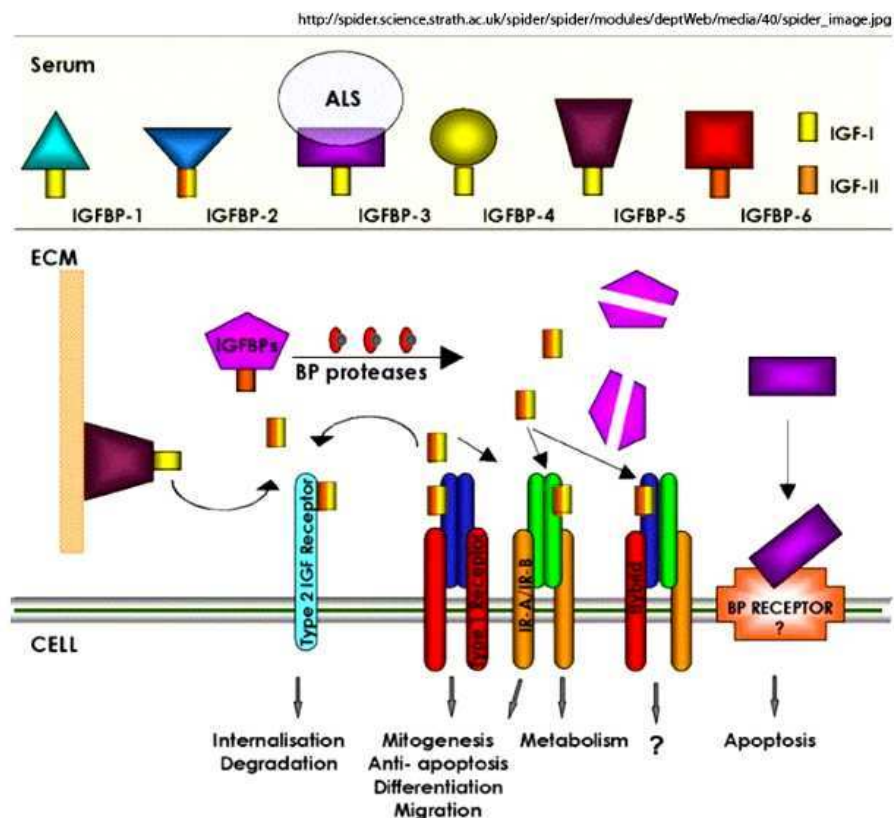


Abb. 9: Schematische Darstellung des IGF-System

Das IGF-System besteht aus den Rezeptoren (IGF1R, IR, IGF1R/IR-Hybride, IGF2R), den Peptid-Liganden (IGF1, IGF2, Insulin) und sechs hochaffinen IGFBPs. IGFs zirkulieren zum größten Teil in einem Komplex mit IGFBP-3 und einer säure-lablen Untereinheit (ALS). Die Proteolyse oder die Bindung der IGFBPs an extrazelluläre Matrix (EZM) führt zur Freisetzung von IGFs. IGFBPs können auch unabhängig von IGFs zelluläre Reaktionen auslösen. Der IGF2R moduliert die Verfügbarkeit von IGF2. (Denley et al., 2005).

Das IGF-System besteht aus den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-like growth factors, IGFs) IGF1 und IGF2, welche als Liganden fungieren, den Typ I und Typ II IGF-Rezeptoren und sechs bisher beim Menschen bekannten IGF-Bindungsproteinen (IGFBPs1-6) (Le Roith, 2003). Die IGFs binden sowohl an Rezeptoren als auch an Bindungsproteine mit hoher Affinität. Dieses System und seine Regulierung sind sehr komplex (**Abb. 9**). Dauerhafte Fehlregulation des IGF-Systems (IGFs, IGF1R, IGFBPs) kann aufgrund des möglichen unkontrollierten Wachstums leicht zur Entwicklung von Tumoren führen (Maki, 2010).

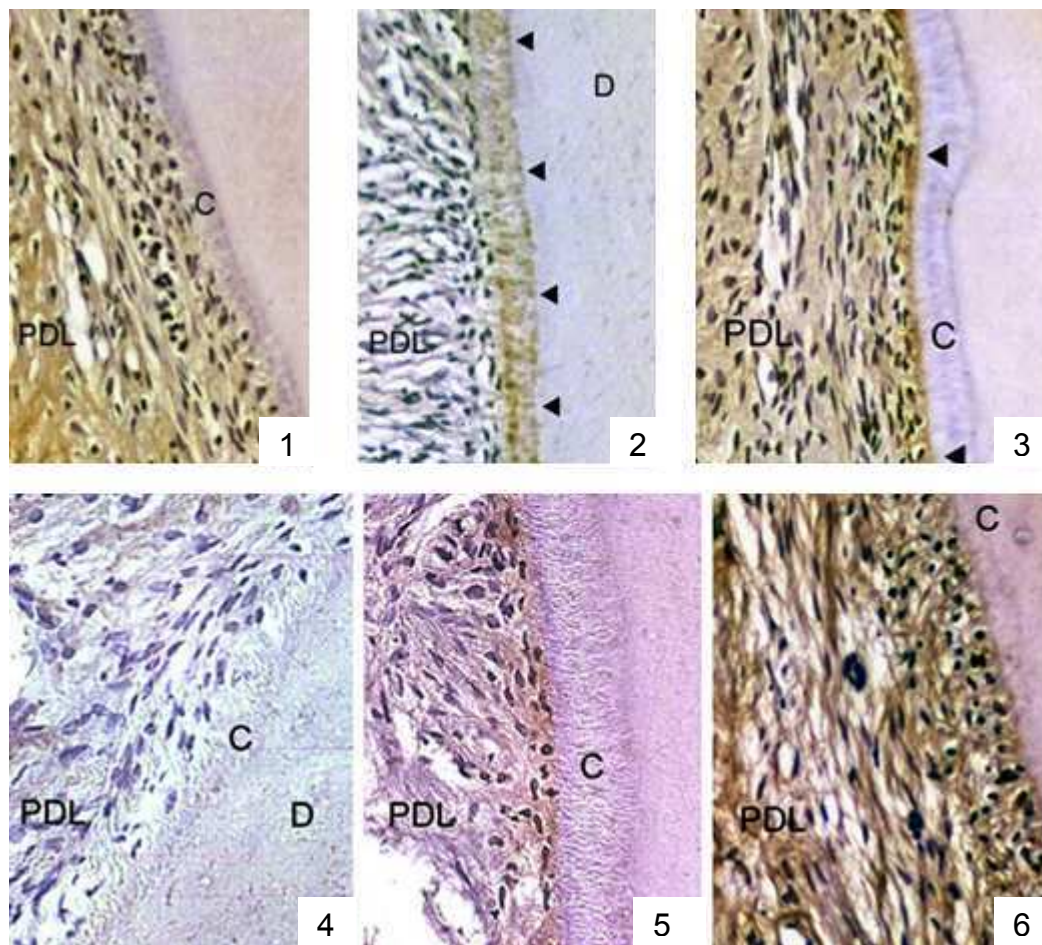


Abb. 10: Immunfärbung von Komponenten des IGF-Systems im Zahnhalteapparat

C – azelluläres faseriges Zement; D – Dentin; PDL – Parodontales Ligament; (1) IGF-I-Färbung im PDL, DAB, x400; (2) IGF-II im PDL und azellulärem Zement (Dreiecke), DAB, x400; (3) IGFBP-2-Färbung in PDL und Zement, speziell im äußeren Zement (Dreiecke), DAB, x400; (4) schwache IGFBP-4-Färbung des PDLs, DAB, x400; (5) IGFBP-5-Färbung der Insertionszone des PDLs ins äußere Zement, DAB, x1600; (6) IGFBP-6-Färbung im PDL, DAB, x400; (Götz et al., 2001, 2003, 2006a, 2006b).

Dem IGF-System konnten protektive, anabole und Überleben-sichernde Effekte auf verschiedene Gewebe (z.B. neuronale, muskuläre, kardiovaskuläre Gewebe) nachgewiesen werden (Kurmasheva and Houghton, 2006; Varela-Nieto et al., 2007). Außerdem übt es einen Einfluss auf orale und dentofaziale Gewebe hinsichtlich Odontogenese, Wachstum, parodontaler Homöostase, Proliferation oder oraler Karzinogenese aus (Werner and Katz, 2004). Fast alle Komponenten des IGF-Systems (IGFs, IGF1R und Bindungsproteine) konnten in Zelltypen des Zahnhalteapparats (Osteoklasten, Osteoblasten, PDL-Fibroblasten und Odontoklasten) von Mensch und Nagetier nachgewiesen werden (**Abb. 10**). Diese kommen unter normalen Bedingungen, aber auch während der Reparatur von Zement und Knochen vor.

1.5.1 Die Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2

IGFs sind Insulin-ähnliche Peptide der Insulin-IGF-Relaxin-Familie mit hoher Strukturhomologie zu Insulin. IGF1 (auch bekannt als Somatomedin C) besteht aus 70 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 7,6 kDa. IGF2 (Somatomedin A) besteht aus 67 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 7,4 kDa (Rinderknecht and Humbel, 1978a, 1978b; Annunziata et al., 2010). Beide IGFs bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, welche in 4 Domänen unterteilt wird (B-C-A-D). Die B- und A-Domänen von IGF1 und IGF2 haben 50 % Sequenzähnlichkeit zu denen von Insulin. Die Gesamtstruktur innerhalb der A- und B-Domänen ist ähnlich wie bei Insulin. Drei Disulfidbrücken tragen zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur bei (Cooke et al., 1991; Sato et al., 1993; Terasawa et al., 1994; Torres et al., 1995; Denley et al., 2005; Annunziata et al., 2010).

IGF1 und IGF2 können mitogene und metabolische Wirkungen haben, die zu Wachstum, Überleben und Differenzierung verschiedener Zelltypen und Geweben beitragen (Cohick and Clemmons, 1993; Stewart and Rotwein, 1996; Chitnis et al., 2008). IGFs sind spezielle Wachstumsfaktoren, die systemisch als Hormone wirken, welche nach Stimulation mit Wachstumshormon in der Leber gebildet werden (Scott et al., 1985). Systemisches IGF1 ist vorrangig für die Regulation der Wachstumshormonsekretion, der Insulinsensitivität und die Größe von Nieren, Leber und Prostata verantwortlich (Ohlsson et al., 2009). Auch lokal können IGFs in vielen Geweben gebildet werden und dort parakrin und autokrin wirken. IGF1 wird z.B. in

Hirn, Muskeln und Knochen produziert (Cohick and Clemmons, 1993; Mohan and Baylink, 1996; Stewart and Rotwein, 1996; Butler and LeRoith, 2001; Annunziata et al., 2010).

1.5.2 Die Rezeptoren

Es gibt beim Menschen mindestens drei Rezeptoren für die Liganden des IGF-Systems, den Insulinrezeptor (IR), den IGF1-Rezeptor (IGF1R) und den IGF2-Rezeptor (IGF2R) (Ullrich et al., 1985; Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1986; Morgan et al., 1987; Annunziata et al., 2010). IR und IGF1R gehören zur Familie der Liganden-aktivierten Rezeptor-Kinasen. Anders als die meisten anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen liegen diese Rezeptoren bereits vor Ligandenbindung in einer heterotetrameren Struktur aus je zwei α/β -Untereinheiten ($IR_{\alpha/\beta}/IR_{\alpha/\beta}$, $IGF1R_{\alpha/\beta}/IGF1R_{\alpha/\beta}$, $IR_{\alpha/\beta}/IGF1R_{\alpha/\beta}$) vor. Jeweils eine transmembrane β -Untereinheit ist mit einer extrazellulären α -Untereinheit durch eine Disulfidbrücke verbunden. Die beiden β -Untereinheiten sind ebenfalls untereinander durch Disulfidbrücken verknüpft (Bhaumick et al., 1981; Chernausek et al., 1981; LeRoith et al., 1995; Chitnis et al., 2008). Durch die Ligandenbindung an den α -Untereinheiten erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, so dass dieser ATP binden und sich selbst phosphorylieren (Autophosphorylierung) kann (Jacobs et al., 1983; Rubin et al., 1983; Wei et al., 1995; Hubbard, 1997; Annunziata et al., 2010). Durch die Autophosphorylierung an den Tyrosinresten Y1131, Y1135, Y1136 in der intrazellulären Region der β -Untereinheit wird die Kinaseaktivität des Rezeptors gesteigert. Dies führt zur weiteren Phosphorylierung in der Juxtamembranregion und am C-terminalen Ende der β -Untereinheiten. Dadurch können diverse intrazelluläre Substratmoleküle andocken (Chitnis et al., 2008). Aufgrund der Diversität der Substratproteine werden verschiedene Signalwege in Gang gesetzt. Substrate sind z.B. die Insulinrezeptorsubstrate (IRS1-4) und SHC (LeRoith et al., 1995; White, 1998; Schlessinger, 2000; Chitnis et al., 2008). IRS aktivieren den PI3K/AKT-Weg, während SHC über die Rekrutierung von Adapterproteinen die Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Wegs einleitet. Die Aktivierung des MAPK-Wegs ist wichtig für die IGF-induzierte Proliferation. Der PI3K/AKT-Weg hingegen vermittelt die metabolischen und antiapoptotischen Wirkungen von IGF1, kann aber auch die

Proliferation unterstützen (Milasincic et al., 1996; Takahashi et al., 1997; Adams et al., 2000).

Der IGF2R ist im Gegensatz zu IR und IGF1R keine Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Er ist ein monomerer, Kation-unabhängiger Mannose-6-Phosphat (M-6-P)-Rezeptor mit einer langen extrazellulären Domäne. Diese enthält 15 sich wiederholende Segmente von 134-167 Aminosäuren, welche eine Sequenzidentität (14-38 %) und eine gleiche Verteilung von Cysteinresten aufweisen. An den Segmenten 3 und 9 befinden sich die Bindungsstellen für Mannose-6-Phosphat. In der Region von Segment 11 kann IGF2 gebunden werden (Ghosh et al., 2003; Martin-Kleiner and Gall Troselj, 2010). Der IGF2R besitzt multifunktionelle Eigenschaften. Er trägt z.B. als löslicher Rezeptor zum Transport von Hydrolasen in die Lysosomen bei. Zahlreiche weitere Liganden ohne M-6-P (z.B. IGF2, uPAR, Retinsäure, Serglycin, Heparanase, cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 - CREG) sind bekannt. Außerdem spielt der Rezeptor eine Rolle bei der Aktivierung von TGF- β (Martin-Kleiner and Gall Troselj, 2010). Die Bindung von IGF2 führt zu dessen Degradierung und damit zur Eliminierung von zu hohen IGF2-Aufkommen.

1.5.3 Die IGF-Bindungsproteine

Die Familie der IGF-Bindungsproteine besteht aus sechs gut charakterisierten Proteinen, welche eine hohe Affinität zu IGFs haben. Sie haben untereinander eine zu 50 % homologe Proteinsequenz. Die korrespondierenden IGFBPs verschiedener Säugetierarten haben eine Sequenzhomologie von 80 % (Rechler, 1993; Kelley et al., 1996; Mohan and Baylink, 2002). Die unreifen IGFBPs besitzen jeweils ein Signalpeptid (20 bis 39 Aminosäuren), welches für die Sekretion von Bedeutung ist (Firth and Baxter, 2002). Alle reifen IGFBPs können deshalb extrazellulär nachgewiesen werden und bestehen aus 216 (IGFBP-6) bis zu 289 (IGFBP-2) Aminosäuren. Sie haben aufgrund verschiedener posttranslationaler Modifikationen ein Molekulargewicht von 24 bis 44 kDa (Drop et al., 1992; Hwa et al., 1999; Baxter, 2000; Clemmons, 2001; Beattie et al., 2006a; Sung et al., 2010). Die konservierte N-terminale Domäne enthält jeweils sechs (IGFBP-1 bis 5) bzw. fünf (IGFBP-6) Disulfidbrücken (Hwa et al., 1999; Neumann and Bach, 1999; Chelius et al., 2001; Firth and Baxter, 2002).

IGF-Bindungsproteine sind multifunktionelle Proteine. Sie sorgen für den Transport der IGFs über das Blut zu den entsprechenden Geweben. Im Blut sind ungefähr 75 % des vorhandenen IGF in Komplexen aus IGFBP-3 und einer Säure-labilen Untereinheit (ALS) gebunden (Baxter and Martin, 1989; Clemmons, 1997; Firth and Baxter, 2002; Annunziata et al., 2010). Diese großen Komplexe (ca. 150 kDa) können nicht durch die Gefäßwand ins Gewebe gelangen und verlängern die Halbwertszeit von IGFs im Blut auf ca. 15 bis 20 Stunden (Zapf, 1995; Mohan and Baylink, 2002). Freies IGF und in kleinen Komplexen (40 bis 50 kDa) mit IGFBPs gebundenes IGF können hingegen leicht das vaskuläre Endothel passieren. Außerdem ist die Halbwertszeit deutlich kürzer als die der großen Komplexe mit ALS (10 min für freies IGF, 30 min für IGFBP-IGF-Komplexe). Die im Blut vorkommenden IGFBPs regulieren die endokrinen Wirkungen von IGFs bzw. deren Bioverfügbarkeit (Mohan and Baylink, 2002).

Außerdem werden IGFBPs lokal von vielen Zellen produziert, und regulieren so parakrine und autokrine Wirkungen von IGFs. Sie verlängern auch hier die Halbwertszeit der IGFs, modulieren Verfügbarkeit und Aktivität. Außerdem konkurrieren sie mit dem IGF1R um freie IGFs, zu denen sie etwa ähnliche Affinitäten haben wie der Rezeptor (Annunziata et al., 2010). Die Bindungsaffinitäten der Bindungsproteine zu IGFs können durch verschiedene Prozesse reguliert werden. Die Regulierung erfolgt z.B. über den Phosphorylierungszustand sowie über die Bindung an die Zelloberfläche oder an Proteine der extrazellulären Matrix (Mohan and Baylink, 2002). Einige Bindungsproteine (z.B. IGFBP-1, -3 und -5) können stimulatorischen, aber auch inhibitorischen Einfluss auf die Wirkung von IGFs haben. Bei IGFBP-1, welches als Phosphoprotein sezerniert wird, wirkt sich eine Dephosphorylierung negativ auf die Bindungsaffinität zu IGF aus. Dies führt zu einer Steigerung der IGF-Effekte (Busby et al., 1988; Wheatcroft and Kearney, 2009). Die Bindung an extrazelluläre Matrix (IGFBP-3 und 5) führt zu einer geringeren Affinität der betroffenen Bindungsproteine zu IGFs. Dadurch können die IGFs kontinuierlich in niedriger Dosierung für den IGF1R bereitgestellt werden, was zu einer Verstärkung der IGF-Wirkung führt (Clemmons, 1998; Jones et al., 1993b; Annunziata et al., 2010). Bei hoher Verfügbarkeit von IGF kommt es ansonsten zu einer Herunterregulation des IGF1R. Die Proteolyse von IGFBPs wird durch diverse spezifische (z.B. IGFBP-4-spezifisch: PAPP-A; IGFBP-5-spezifisch:

Komplementfaktor Cs1, ADAM-9) und unspezifische Proteasen (z.B. Plasmin, Kathepsin D, PSA) vermittelt und führt zu einer signifikant reduzierten Affinität der IGFBP-Fragmente für IGFs (Conover, 1995; Fowlkes et al., 1995; Rajah et al., 1995; Rajaram et al., 1997; Lawrence et al., 1999; Maile and Holly, 1999; Mohan and Baylink, 2002). Aufgrund der zahlreichen Modifikationsmöglichkeiten des IGF-Systems auf Ebene der Bindungsproteine wird deutlich, dass die Wirkung der einzelnen Bindungsproteine stark von Zelltyp, Gewebetyp, posttranslationalen Modifikationen, aber auch von der Bindungsprotein-Konzentration abhängig ist.

1.5.3.1 IGF-unabhängige Funktionen von IGFBPs

IGFBPs können auch IGF-unabhängige Funktionen ausüben. Dies betrifft vor allem Migration, Wachstum und Apoptose. IGFBP-1 kann z.B. Zelltyp-abhängig die Migration von Zellen beeinflussen. Für IGFBP-3 wurde nachgewiesen, dass es IGF-unabhängig das Wachstum und die Angiogenese inhibiert und die Apoptose fördert (Rajah et al., 1997; Zadeh and Binoux, 1997; Liu et al., 2007a). Die inhibitorische Wirkung auf die Proliferation kann zumindest teilweise auf die Aktivierung von Phosphotyrosin-Phosphatasen durch IGFBP-3 zurückgeführt werden. Diese verhindern die Signalübertragung über den IGF1R und IRS1 bzw. IRS2, welche auf der Phosphorylierung von Tyrosinresten beruht (Ricort and Binoux, 2002). Das im Knochen am stärksten vorkommende IGFBP-5 kann Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten fördern (Andress et al., 1993; Miyakoshi et al., 2001; Conover, 2008). Diese IGF-unabhängigen Wirkungen von IGFBPs können z.B. durch spezifische Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen erfolgen (IGFBP-3-Rezeptor in verschiedenen Zelllinien, putativer IGFBP-5-Rezeptor in Osteoblasten) (Andress, 1998; Jogie-Brahim et al., 2009).

Ein weiterer IGF-unabhängiger Wirkmechanismus ist die Translokation von IGFBPs in den Nukleus, welche durch Importin- β (IGFBP-3 und 5) oder Importin- α (IGFBP-6) vermittelt wird (Radulescu, 1994; Schedlich et al., 2000; Iosef et al., 2008). IGFBP-3 kann mit nuklearen Rezeptoren, wie z.B. dem Retinsäurerezeptor α (RXR α), RAR und Nur77 interagieren und die Transkription von Zielgenen regulieren (Liu et al., 2000; Schedlich et al., 2004; Lee et al., 2007). Auch die Bindung von IGFBP-5 an das in vielen Osteoblasten-Zelllinien stark exprimierte FHL2 (Four and a half LIM

domain Protein) konnte gezeigt werden (Amaar et al., 2002). Das FHL2-Protein besitzt selbst keine Kernlokalisationssequenz (NLS - nuclear localization signal) und wird vermutlich durch die Bindung an IGFBP-5 co-transloziert (Mohan and Baylink, 2002).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die differenzielle Analyse der Beteiligung des IGF-Systems bei der Stressregulation von PDL-Zellen in vitro. Zur Simulation einer Parodontitis (Entzündung, Hypoxie) werden die PDL-Zellen mit IL-1 β stimuliert und unter hypoxischen Verhältnissen inkubiert. Es wird untersucht, welchen Einfluss Entzündung und Hypoxie auf die Expression von Komponenten des IGF-Systems haben. Außerdem wird deren Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation und die Wundheilung bei PDL-Zellen untersucht. Festzustellen, ob exogen zugeführtes IGF1 einen protektiven Effekt auf die Zellen hat und eventuell die negativen Wirkungen von Hypoxie und Entzündung mindern bzw. aufheben kann, ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Neue Erkenntnisse im Bezug auf die Regulation des IGF-Systems im Parodont unter Stressbedingungen könnten längerfristig dazu beitragen, regulatorische Prozesse bei Parodontalerkrankungen und der Regeneration zu manipulieren. Das IGF-System mit seiner außerordentlichen Komplexität in der Regulation und Wirkung bietet genügend Potenzial dazu. Vor allem aufgrund der vielen multifunktionellen Bindungsproteine und deren Regulationsmechanismen bieten sich viele Möglichkeiten der Manipulation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Firma
Autoklav Modell Varioklav 25T	H+P Labortechnik, Oberschleissheim, D
Analysewaage Sartorius	Sartorius, Göttingen, D
Analytic A 120 S	
ChemiDoc™ XRS System	Bio-Rad, München, D
Einkanalpipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg, D
Einkanalpipetten Pipetman Classic™	Gilson, Middleton, WI, USA
Elektr. Pipettierhilfe Pipetus® -akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Elektrophorese-System MINI SUB™	Bio-Rad, München, D
DNA CELL	
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss, Jena, D
FugeOne™ Mikrozentrifuge	Starlab, Ahrensburg, D
Gasflaschen (Kohlendioxid)	Linde, Pullach, D
Gasflaschen (Stickstoff)	Linde, Pullach, D
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gefriertruhe Revco ULT 790-3-V31	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
(-80°C)	USA
Hypoxiestation Invivo ₂ 400	Ruskin Technology, Pencoe, UK
iCycler® Thermal Cycler	Bio-Rad, München, D
Inkubator Heraeus® BB15 (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
	USA
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, D
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroplatten-Reader Modell 680	Bio-Rad, München, D

Gerät	Firma
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, D
NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen, D
Netzgerät PowerPac Basic™ 300V	Bio-Rad, München, D
pH-Meter	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, D
SDR SensorDish Reader®	PreSens, Regensburg, D
Sicherheitswerkbank Heraeus® HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge 5804 R + Ausschwingrotor A-4-44	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D

2.1.2 Verbrauchsmaterial, Plastik- und Glasware

Material	Firma
Deckgläser (Glas, 15 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Deckgläser (Thermanox® Plastik)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Einweg-Filtereinheit (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Aubagne Cedex, F
Filterspitzen	Starlab, Ahrensburg, D
Immuno 96 MicroWell™ MaxiSorp™ + PolySorp™, transparent	Nunc, Langenselbold, D
Klebefolien für Versiegelung von Mikroplatten, transparent	Bio-Rad, München, D
Kombitips Plus (2,5 / 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Kryo-Röhrchen	Nunc, Langenselbold, D
Mikroplatten, 96-well, F-Boden, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Molecular Weight Cut-Off-Säulen (MWCO 10 kDa)	Roth, Karlsruhe, D
Multiwell-Platten (24-Well, OxoDish®)	Presens, Regensburg, D

Material

Multiwell-Platten für Zellkultur
(24-, 12-, 6-well-Platten)
Objektträger (75 x 25 x 1 mm)
PCR-Platten (96-Well)

Pechiney Parafilm M

Pipettenspitzen
Polypropylen-Röhrchen (15 / 50 ml)
Reaktionsgefäße (1,5 / 2 ml)
Serologische Pipetten (5 / 10 / 25 ml)
Skalpelle
Spritzen (2 / 5 ml)
Sterilfilter
Zellkulturschalen (8,7 / 58 cm²)
Zellkulturflaschen (75 cm²)
Zellschaber

Firma

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Peglab, Erlangen, D
Pechiney Plastic Packaging, Des Moines, IA, USA

Sarstedt, Nümbrecht, D
Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Eppendorf, Hamburg, D
Corning, Corning, NY, USA
Feather Safety Razor, Osaka, J
Sartorius Stedim Biotech, Aubagne Cedex, F
Millipore, Schwalbach/Ts., D
Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie

100 bp DNA Ladder
ABTS
Agarose
β-Mercaptoethanol
Borsäure
Bromphenol-Blau
BSA
DABCO
DMEM
DMSO
Ethanol
Ethidiumbromid

Firma

Promega, Mannheim, D
Sigma-Aldrich, München, D
Promega, Mannheim, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Roth, Karlsruhe, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Roth, Karlsruhe, D
Invitrogen, Karlsruhe, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Merck, Darmstadt, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D

Chemikalie

FBS
Glycerol
Glycin
HCl
KCl
KH₂PO₄
Mowiol 4-88
NaCl
Na₂EDTA
Na₂HPO₄
NaOH
Natrium-Azid
PBS Tabletten
Penicillin / Streptomycin
(10000 U/ml) / (10 mg/ml)
PFA
Precision™ 2X qPCR Mastermix
+ SYBR® Green
SDS
Tris
Trypsin-EDTA, 0,05 % (w/v)
Tween® 20
Ziegenserum

Firma

Invitrogen, Karlsruhe, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Merck, Darmstadt, D
Merck, Darmstadt, D
Merck, Darmstadt, D
Roth, Karlsruhe, D
Merck, Darmstadt, D
Merck, Darmstadt, D
Merck, Darmstadt, D
Merck, Darmstadt, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Invitrogen, Karlsruhe, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
PrimerDesign, Southampton, UK
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
MP Biomedicals Europe, Illkirch, F
Invitrogen, Darmstadt, D
Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Dako, Glostrup, DK

2.1.4 Kits

Kit

Cell Proliferation ELISA, BrdU
(colorimetrisch)
Cell Proliferation Reagent WST-1
DuoSet® ELISA Development System

Firma

Roche Diagnostics Deutschland,
Mannheim, D
Roche Diagnostics Deutschland,
Mannheim, D
R&D Systems Europe, Abingdon, UK

Kit	Firma
iScript™ Select cDNA Synthese KIT	Bio-Rad, München, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D

2.1.5 Rekombinante Wachstumsfaktoren und Zytokine

Rekombinante Peptide / Proteine	Firma
Insulin-like Growth Factor I, human (E. coli)	Jena Bioscience, Jena, D
Interleukin-1 beta, human (E. coli)	PromoCell, Heidelberg, D

2.1.6 Antikörper

Primär-Antikörper	Quelle	Endkonz.	Firma
Mouse monoclonal anti-human HIF-1 α (H1 α 67) sc-53546	Maus	Immunfluoreszenz: 1 μ g/ml (1:200)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Sekundär-Antikörper	Quelle	Endkonz.	Firma
Texas Red®-X Goat anti-mouse IgG (H+L)	Ziege	Immunfluoreszenz: 10 μ g/ml (1:200)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 QuantiTect Primer Assays

Gen	Bezeichnung	Produkt	Ref.-Sequenz
IGF1	Hs_IGF1_1_SG	140 bp	NM_000618
IRS1	Hs_IRS1_1_SG	109 bp	NM_005544
N-Cadherin (CDH2)	Hs_CDH2_1_SG	102 bp	NM_001792
OB-Cadherin (CDH11)	Hs_CDH11_1_SG	104 bp	NM_001797

Gen	Bezeichnung	Produkt	Ref.-Sequenz
Osteocalcin (BGLAP)	Hs_BGLAP_1_SG	90 bp	NM_199173
Osteopontin (SPP1)	Hs_SPP1_1_SG	115 bp	NM_000582
Periostin (POSTN)	Hs_POSTN_1_SG	114 bp	NM_006475
S100A4	Hs_S100A4_1_SG	120 bp	NM_002961
IL-1 β	Hs_IL1B_1_SG	117 bp	NM_000576
IL-6	Hs_IL6_1_SG	107 bp	NM_000600
IL-10	Hs_IL10_1_SG	113 bp	NM_000572
HIF-1 α	Hs_HIF1A_1_SG	104 bp	NM_001530
VEGFA	Hs_VEGFA_5_SG	215 bp	NM_003376

Dargestellt sind die offiziellen Bezeichnungen der Qiagen-Produkte, die Größe des zu erwartenden Produktes sowie die Referenzsequenz der mRNA, auf deren Grundlage die Primer gestaltet wurden.

2.1.7.2 Individuell designte Primer

Gen	Sequenz		Produkt	Ref.-Sequenz
Aktin	FOR	5'- CTT CCT GGG CAT GGA GTC -3'	217 bp	NM_001101
	REV	5'- GTA CTT GCG CTC AGG AGG AG -3'		
IGF2	FOR	5'- CGC GGC TTC TAC TTC AGC A -3'	225 bp	NM_000612
	REV	5'- GGA CTG CTT CCA GGT GTC ATA -3'		
IGF1R	FOR	5'- TGA GGA TCA GCG AGA ATG TG -3'	171 bp	NM_000875
	REV	5'- TAT CCT GTT TTG GCC TGG AC -3'		
IGFBP-1	FOR	5'- CCC AGA GAG CAC GGA GAT AA -3'	159 bp	NM_000596
	REV	5'- CAG GGC TCC TTC CAT TTT T -3'		
IGFBP-2	FOR	5'- CAG GAC TCC CTG CCA ACA -3'	166 bp	NM_000597
	REV	5'- CCC GTT CAG AGA CAT CTT GC -3'		
IGFBP-3	FOR	5'- CAG CTC CAG GAA ATG CTA GTG -3'	250 bp	NM_000598
	REV	5'- CTA CGG CAG GGA CCA TAT TC -3'		

Gen	Sequenz	Produkt	Ref.-Sequenz
IGFBP-4	FOR 5'- CTG ACA AGG ACG AGG GTG AC -3'	258 bp	NM_001552
	REV 5'- GGA TGG GGA TGA TGT AGA GG -3'		
IGFBP-5	FOR 5'- GAG CAA GTC AAG ATC GAG AGA GA -3'	170 bp	NM_000599
	REV 5'- TTG GAC TGG GTC AGC TTC TT -3'		
IGFBP-6	FOR 5'- GCT GTT GCA GAG GAG AAT CC -3'	242 bp	NM_002178
	REV 5'- TCA CAA TTG GGC ACG TAG AG -3'		
ID1	FOR 5'- AAA CGT GCT GCT CTA CGA CA -3'	153 bp	NM_181353
	REV 5' GAT TCC GAG TTC AGC TCC AA -3'		
ID2	FOR 5'- CGT GAG GTC CGT TAG GAA AA -3'	237 bp	NM_002166
	REV 5'- ATA GTG GGA TGC GAG TCC AG -3'		

Dargestellt sind die Sequenzen der Vorwärts-Primer (FOR) und der entsprechenden Rückwärts-Primer (REV). Außerdem sind die Längen der zu erwartenden Produkte und die Referenzsequenz der jeweiligen zur Primergestaltung verwendeten mRNA angegeben.

2.1.8 Software und Online-Tools

Software / Online-Tool	Firma / Referenz
AxioVision 4.7	Carl Zeiss, Jena, D
GraphPad Prism™ 4.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
NCBI Blast	National Center for Biotechnology Information (NCBI)
Primer3	(Rozen and Skaletsky, 2000)
Quantity One	Bio-Rad, München, D

2.1.9 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	10 % Ziegenserum 1 % BSA

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
EDTA-Stock / pH 8,0	0,5M Na ₂ EDTA
Einbettmittel für Fluoreszenz	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 4-88 12 ml Tris-HCl (0,2 M, pH 8,5) 25 mg/ml DABCO 12 ml Wasser
Glycin-HCl / pH 2,5	1M Glycin
Ladepuffer für Agarosegel (6x)	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerol
NaCl-Lösung	0,5 M NaCl
PBS (1x) / pH 7,4	137 mM NaCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
PBST 0,05 %	0,05 % Tween® 20 in 1x PBS
PBST 5 %	5 % Tween® 20 in 1x PBS
PFA-Lösung / pH 7,4	4 % PFA in 1x PBS
SDS-Lösung (1 %)	1 % SDS in Wasser
TBE (1x) / pH 8,3	89 mM Tris 89 mM Borat 2 mM EDTA (aus EDTA-Stock, 0,5 M)
Tris-Lösung (pH 11)	1 M Tris

2.2 Zellkultur

2.2.1 Isolierung von PDL-Zellen aus der Wurzelhaut extrahierter Zähne

Im Rahmen routinemäßig durchgeführter oralchirurgischer Maßnahmen wurden bei 6 jugendlichen Spendern im Alter von 8 bis 20 Jahren Zähne entfernt. Eine Einverständniserklärung der Eltern bzw. der volljährigen Spender lag vor. Die Verwendung des gewonnenen Gewebes wurde durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn geprüft und genehmigt (Antrag Ethikkommission Ref.-Nr.: 029/08). Die Zähne wurden direkt nach der Extraktion in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) eingelegt und danach im Labor weiter verarbeitet. Hierzu wurde der Zahn mit einer Zange gehalten und mit einem Skalpell an mehreren Stellen etwas Gewebe (Parodontales Ligament) vom mittleren Wurzeldrittel abgekratzt und in eine Zellkulturschale (58 cm²) überführt. Auf dieses Material wurden Deckgläser (Plastik) aufgelegt, damit die Zellen einfacher Kontakt mit der Schale bekommen und nicht im vorsichtig zugefügten DMEM mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep schwimmen. Die Zellkulturschale wurde in den Inkubator gestellt und unter 5 % CO₂ bei 37 °C mindestens eine Woche unangetastet gelassen. Zwischenzeitlich wurde die Schale auf sichtbare Kontaminationen überprüft. Nach einer Woche wurde dann wöchentlich einmal das Medium gewechselt bis nach 2 bis 4 Wochen die ersten PDL-Zellen auswuchsen. Danach erfolgte der Mediumwechsel alle 3 Tage. Als dann größere Rasen mit PDL-Zellen zu sehen waren, wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA bei 37 °C für ca. 5 min im Inkubator von der Schale gelöst und in DMEM (10 % FBS, 1 % Pen/Strep) aufgenommen, um die Trypsinierung zu stoppen. Dann wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm²) überführt und die Flasche zur weiteren Kultur in den Brutschrank gestellt (Passage 1, P1).

2.2.2 Splitten der Zellen

Bei konfluenten Zellkulturflaschen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im Brutschrank für 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA inkubiert. Als sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde die Trypsin-Reaktion mit der doppelten Menge serumhaltigen Medium abgestoppt. Mit einer 10 ml-Pipette wurden die Zellen vom Boden der Flaschen gespült und die Zellsuspension homogenisiert. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:3 auf weitere Zellkulturflaschen verteilt und diese mit serumhaltigen Medium auf 10 ml aufgefüllt. Durch jeden Splitvorgang wurde die Passagenanzahl um 1 erhöht.

2.2.3 Einfrieren der Zellen

Zur Lagerung der Zellen mussten die Zellen eingefroren werden, so dass die Versuche alle aus einem Stock durchgeführt werden konnten. Für die Versuche wurden größere Mengen an Zellen in Passage 4 eingefroren. Hierfür wurden mehrere konfluente Flaschen (75 cm²) der Passage 3 jeweils zweimal mit PBS gewaschen und wiederum im Brutschrank für 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA inkubiert. Als sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde die Trypsin-Reaktion mit der doppelten Menge serumhaltigen Medium abgestoppt. Mit einer 10 ml-Pipette wurden die Zellen vom Boden der Flaschen gespült und die Zellsuspension homogenisiert. Zellen vom gleichen Spender wurden in einem 50 ml-Reaktionsgefäß zusammengeführt und bei 500 g für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Ausschwingrotor A-4-44). Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt. Die Pellets wurden in Einfriermedium (DMEM, 10 % FBS, 1 % Pen/Strep und 5 % DMSO) resuspendiert und in 1 ml großen Portionen in Kryo-Röhrchen abgefüllt. Diese wurden dann bei -80 °C in einer Styroporbox behutsam eingefroren.

2.2.4 Auftauen der Zellen

Die in Passage 4 eingefrorenen Zellen wurden zügig aufgetaut, in 10 ml DMEM (10 % FBS, 1 % Pen/Strep) aufgenommen und auf eine Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät.

2.2.5 Gewinnung von Überständen für ELISA

Die Überstände der mit IL-1 β und Hypoxie stimulierten sowie der unstimulierten Kontrollen wurden nach Beendigung der Stimulation entnommen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C eingefroren.

2.3 Charakterisierung der Zellen

2.3.1 Zellmorphologie

Zur Charakterisierung wurden die PDL-Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und Fotos aufgenommen, um Aussagen zur Morphologie treffen zu können.

2.3.2 Grundexpression ausgewählter Gene

Zur weiteren, molekularbiologischen Charakterisierung wurde untersucht, wie hoch die Grundexpression verschiedener Gene in prä-konfluenten und konfluenten Kulturen war. Hierbei wurden Differenzierungsmarker, Differenzierungsinhibitoren, Cadherine und IGFBPs untersucht. Als Primer dienten z. T. die in **Abschnitt 2.1.7** aufgelisteten Oligonukleotide. Das jeweils verwendete PCR-Programm wird später in Abschnitt **2.4.3.3** dargestellt.

2.3.3 Messung des Sauerstoffbedarfs von humanen PDL-Zellen

Die Fragestellung war, wieviel Sauerstoff die PDL-Zellen benötigen, und somit welche Sauerstoffkonzentration im Inkubationsgas maximal eingestellt sein sollte, um die Zellen echter Hypoxie auszusetzen.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs der PDL-Zellen erfolgte mit Hilfe des SDR SensorDish Reader® (PreSens, Regensburg, **Abb. 11**). Dazu wurden die Zellen in 24-Well-Platten (OxoDish®, PreSens, Regensburg) mit einem Sauerstoffsensor auf dem Boden jedes Wells ausgesät. In **Abb. 12A** ist das Funktionsprinzip des Sensors dargestellt. Der Sensor enthält einen Lumineszenzfarbstoff, welcher durch den SDR angeregt wird. Die Dauer der entstehenden Lumineszenz ist abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung des Sensors und kann nicht-invasiv vom SDR ausgelesen werden. Die zugehörige Software (**Abb. 12B**) rechnet die Messdaten um und zeigt den in Sensornähe anwesenden Sauerstoffgehalt im

Medium an. Dieser kann in diversen Einheiten wiedergegeben werden und wird auch graphisch mit Zeitverlauf angezeigt. Es handelt sich bei der Messung um eine Echtzeit-Messung.

Zur Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs unter den verschiedenen Bedingungen wurden 100 % konfluente Zellen wie oben beschrieben mit IGF1 und/oder IL-1 β stimuliert. Zur Demonstration der Zellzahlabhängigkeit wurden 100 % konfluente sowie 50 % konfluente Zellen verwendet. Die Dissoziationskonstante des Mediums, die Mediumhöhe als auch die Temperatur spielen eine bedeutende Rolle (Metzen et al., 1995). Die Mediumhöhe betrug 0,26 cm, die Temperatur 37 °C. Diese Faktoren wurden konstant auch für die folgenden Experimente genutzt.



Abb. 11: Darstellung des SDR SensorDish Reader®

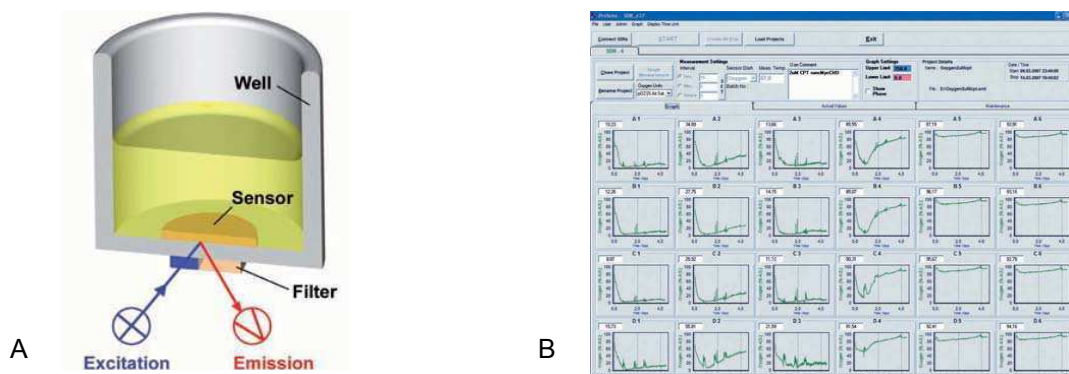


Abb. 12: Sauerstoffsensor und Software

(A) Der SDR regt den Sensor an und misst die Dauer der resultierenden Lichtemission (abhängig vom Sauerstoffpartialdruck). (B) Mit Hilfe der zugehörigen Software werden die Daten aus bis zu 24 Wells in Grafiken umgewandelt.

Quelle: PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg; <http://www.presens.de> (Abb. 11 und 12)

Die Sensor-Platte mit den stimulierten Zellen wurde auf dem SDR platziert, gemeinsam mit diesem in den Inkubator gestellt und bei Standardbedingungen (21 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) über 24 Stunden kultiviert. Während dieser Zeit wurde der Sauerstoff-Gehalt alle 15 Minuten gemessen. In der initialen Phase sind die Ergebnisse noch ungenau, da die Temperatur des frischen Mediums und der Platte selbst noch etwa 2 bis 3 °C unter der gewünschten Temperatur von 37 °C liegen. Um zu sehen, wieviel Sauerstoff durch das Medium hindurch am Boden der Wells angelangt, wurden zellfreie Kontrollen mitgeführt.

2.4 Stimulationsversuche

Nach Erreichen von 80-100 % Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben trypsinisiert und für die Versuche ausgesät. Hierbei wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet und gleichmäßig auf Zellkulturschalen (8,7 cm²) verteilt. Diese wurden dann im Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) kultiviert. Bei den Zellen zur Langzeitstimulation (24 h, 48 h und 72 h) wurde bei ca. 50 % Konfluenz das Serum auf 1 % reduziert. Bei den Zellen, die für kurze Zeiträume (2 h, 4 h, 8 h) stimuliert werden sollten, wurde bei ca. 70 % Konfluenz das Serum auf 1 % reduziert. Nach 24 Stunden erfolgten die Stimulationen mit 10 nM rhIGF1 (Jena Bioscience, Jena), 60 pM IL-1 β (Promokine, Heidelberg) und mit Kombinationen aus diesen beiden Faktoren unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Diese Konzentrationen wurden in Vorversuchen und vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe ermittelt. Die Hypoxiestimulationen wurden in einer Invivo₂ 400 Hypoxiestation (Ruskin, Pencoed, UK) durchgeführt.

2.4.1 Nachweis von HIF-1 α mittels Immunofluoreszenz

Zellen wurden in 6-Well Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) auf Glas-Deckgläsern (Marienfeld, Lauda-Königshofen) ausgesät. Nach Beendigung der Stimulation mit IGF1, IL-1, Hypoxie und deren möglichen Kombinationen wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit einer Paraformaldehydlösung (4 % in PBS, pH 7,4) für 10 Minuten fixiert. Das Paraformaldehyd war von Sigma-Aldrich (München). Nach der Fixierung wurden die Wells dreimal 5 Minuten mit PBS

gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen erfolgte mit einer Mischung aus 10 % Ziegen Serum und 1 % BSA in PBS. Hierfür wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten in jeweils einem Tropfen (40 µl) der Blockierungslösung auf Parafilm in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Blockierung wurden die Deckgläser nach vorsichtigem Abtropfen wiederum mit der Zellseite nach unten auf Parafilm in jeweils 20 µl einer primären Antikörperlösung (hier 1:200 in PBST, siehe **Abschnitt 2.1.6**) innerhalb einer feuchten Kammer über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgten drei 5-minütige Waschschrte mit PBST. Hierfür wurden die Deckgläser in 12-Well-Platten überführt. Danach wurden die Deckgläser nach obigem Schema in 20 µl des sekundären Antikörpers (hier 1:200 in PBST, siehe **Abschnitt 2.1.6**) für 1 Stunde lichtgeschützt inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit PBS für je 5 Minuten. Zum Abschluss erfolgte ein weiterer Waschschrte für 5 Minuten mit bidestilliertem Wasser. Nach vorsichtigem Abtropfen wurden die Deckgläser in jeweils einem Tropfen (15 µl) Mowiol mit DABCO (beides Roth, Karlsruhe) auf Objektträgern eingebettet. Die Präparate wurden über Nacht zum Trocknen des Einbettmittels in den Kühlschrank gelegt. Danach erfolgte die mikroskopische Auswertung mittels AxioVision Software am AxioImager (ZEISS, Jena).

2.4.2 Proliferations-Tests

2.4.2.1 BrdU Assay

Für diesen Test wurden PDL-Zellen in 96-Well-Platten jeweils als 6-fach Bestimmung ausgesät und wie oben beschrieben unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit IGF1 und/oder IL-1β stimuliert. Nach Beginn der Stimulation wurde BrdU-Lösung (Endkonzentration: 10 µM) hinzugegeben. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert, danach fixiert und denaturiert. Die weitere Behandlung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nach Inkubation mit dem Kit-internen, Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen BrdU und mehreren Waschschrten wurde ABTS-Substratlösung zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit

H₂SO₄ (Endkonzentration 0,2 M) abgestoppt und nach leichtem Schütteln der Platte bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) im ELISA-Reader gemessen.

2.4.2.2 WST-1 Assay

Für diesen Test wurden PDL-Zellen in 96-Well-Platten jeweils als 6-fach Bestimmung ausgesät und wie oben beschrieben unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit IGF1 und/oder IL-1 β stimuliert. Nach 24 Stunden wurde zu dem jeweils 100 μ l Inkubationsmedium jeweils 10 μ l gebrauchsfertige Lösung mit dem Tetrazolium-Salz WST-1 (Roche, Mannheim) zugegeben. Danach wurden die Zellen weitere 4 Stunden inkubiert. Das Tetrazolium-Salz WST-1 wird durch mitochondriale Enzyme zu einem wasserlöslichen Formazan gespalten, welches eine dunkelrote Farbe hat und kann dann durch eine kolorimetrische Messung des entstandenen Formazans bei 450 nm im ELISA-Reader (Bio-Rad, München) quantifiziert werden.

2.4.3 Wundheilungsexperimente

PDL-Zellen wurden wie oben beschrieben auf Zellkulturschalen (8,7 cm²) ausgesät. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde das Serum auf 1 % reduziert. Etwa 24 Stunden später erfolgte die „Verwundung“ der Kulturen mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze durch vorsichtiges Zerkratzen des Zellrasens (**Abb. 13**).

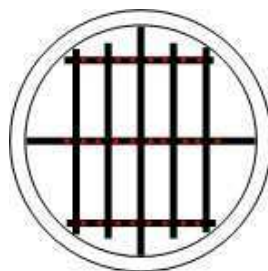


Abb. 13: Schematische Darstellung des „Verwundungs“-Musters

Messpunkte befinden sich in Nähe der Kreuzungspunkte

Danach erfolgte die Stimulation mit IGF1, IL-1 β . Die „Wunden“ der normoxischen Proben wurden nach jeweils 0 h, 24 h, 48 h, und 72 h vermessen. Bei den

hypoxischen (0,5 % O₂) Proben wurden für jeden Zeitpunkt extra Schalen angelegt. Alle „Wunden“ wurden vor dem Einstellen in die Hypoxie und dann nach entweder 24 h, 48 h oder 72 h vermessen. Für die Messungen wurden Fotos der verschiedenen Wundgebiete mit dem AxioImager (Zeiss) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch eine Vermessung der Wundfläche mit der zugehörigen Software AxioVision (Zeiss), wobei auffällige Zellformationen als Referenzpunkte dienten.

2.4.4 Differenzielle Genexpression in PDL-Zellen

2.4.4.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Stimulationsversuchen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden pro Schale 350 µl Lyse-Puffer auf die Zellen pipettiert, mit einem Zellschaber (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) ordentlich verteilt und wieder auf eine Seite der Schale zusammengeschoben. Danach wurden die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und bei -80 °C eingefroren.

Der Lysepuffer bestand aus:

- RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
 - > enthält Guanidinthiocyanat (GTC)
- β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München) 1:100 v/v

Am nächsten Tag wurden die Proben wieder aufgetaut und mit Hilfe des RNeasy Mini Kits unter Anwendung des Herstellerprotokolls verarbeitet. Die RNA wurde im letzten Schritt mit je 30 µl RNase-freiem Wasser von den Mini-Säulen extrahiert und während der Zentrifugation in frischen Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Die Menge der RNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers ND-1000 (Peglab, Erlangen) ermittelt. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Aus Gesamt-RNA-Template wurde mittels iScriptTM select Kit (BIO-RAD, München) gemäß Herstellerprotokoll die cDNA synthetisiert.

Der Ansatz ist in **Tabelle I** dargestellt. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurde der 20 µl Ansatz mit 60 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt, um genügend Material zur Verfügung zu haben.

2.4.4.2 Reverse Transkription

5x iScript select reaction mix	4 µl
Oligo(dT)20 primer	2 µl
RNA sample (1 µg total RNA)	x µl
Nuklease-freies Wasser	13 µl –x µl
iScript reverse transcriptase	1 µl

Totalansatz	<u>20 µl</u>

Tab. I: Ansatz für die cDNA-Synthese mittels iScript™ Select Kit

2.4.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Untersuchung der differentiellen Genexpression erfolgte am iCycler® Thermal Cycler (BIO-RAD, München), wobei teilweise QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden, **Abschnitt 2.1.7.1**) als auch selbst designte Primerpaare (Metabion, Martinsried) verwendet wurden. Primersequenzen sind in **Abschnitt 2.1.7.2** dargestellt. Die selbst designten Primer wurden mit Hilfe des Onlineprogramms „Primer3“ sowie NCBI Referenzsequenzen ausgewählt und mit NCBI BLAST auf mögliche Bindungsstellen im menschlichen Genom und Transkriptom überprüft. SYBR® Green diente als Fluorophor zur Echtzeit-Darstellung der generierten PCR-Produkte. Jeweils 1 µl cDNA wurde zu einem Mastermix, welcher die jeweiligen spezifischen Primer und „Precision™ 2X qPCR Mastermix“ (PrimerDesign, Southampton, UK) inklusive SYBR® Green enthielt, hinzu gegeben. Die Ansätze erfolgten in 96-Well PCR-Platten (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen), welche mit transparenter Klebefolie (BIO-RAD, München) versiegelt wurden.

	Funktionen, beteiligt bei (Beispiele)
β-Aktin	Bildung des Zytoskeletts, Stressfasern, Housekeeping-Gen
N-Cadherin	Zell-Zell-Kontakt, Zell-EZM-Kontakt, Migration
OB-Cadherin	Zell-Zell-Kontakt, Zell-EZM-Kontakt, Osteoblasten-Differenzierung,
Osteocalcin	Osteoblasten-Marker, Knochenbildung, Knochenmineralisierung
Osteopontin	Osteoblasten-Marker, Osteoklasten-Marker, Zelladhäsion
	Knochenbildung
Periostin	Zelladhäsion, Knochen- und Zahnbildung
	Signaltransduktion über verschiedene Rezeptoren, (z.B. Integrine)
S100A4	Marker für mesenchymale Zellen, Motilität
ID1	Angiogenese, negative Regulation von Transkriptionsfaktoraktivität
	Zell-Zyklus-Regulation
ID2	Angiogenese, negative Regulation von Transkriptionsfaktoraktivität
	Zell-Zyklus-Regulation
IGF1	mitogen, Proliferation, Differenzierung, antiapoptotisch
IGF2	pränatale Skelett- und Muskelentwicklung
	Stimulation der Osteoklastogenese
IGF1R	Rezeptor-Tyrosin-Kinase für IGF, mitogen, antiapoptotisch
IRS1	Mediator der IGF- und Insulin-Signaltransduktion
IGFBP-1	Modulation der IGF-Aktivität
	IGF-unabhängige Signaltransduktion (z.B. über Integrine)
IGFBP-2	Modulation der IGF-Aktivität
	IGF-unabhängige Signaltransduktion (z.B. über Integrine)
IGFBP-3	Modulation der IGF-Aktivität, Proliferation, Apoptose,
	Interaktion mit diversen Oberflächenmolekülen und EZM-Proteinen,
	Interaktionen mit Plasmaproteinen und nukleären Proteinen, u.a.
IGFBP-4	Modulation der IGF-Aktivität
IGFBP-5	Modulation der IGF-Aktivität, Proliferation, Apoptose,
	Interaktionen mit Oberflächenmolekülen und EZM-Proteinen,
	Interaktionen mit Plasmaproteinen und nukleären Proteinen, u.a.
IGFBP-6	Modulation der IGF-Aktivität
IL-1β	Immunantwort, Entzündung, proinflammatorisch,
	negative Regulation der Proliferation
IL-6	Akute-Phase-Antwort, finale Differenzierung von B-Zellen,
	Lymphozyten-, Monozytendifferenzierung
IL-10	antiinflammatorisch, Regulation von Entzündung,
	Proliferation und Differenzierung von B-, T- und Mastzellen
HIF-1α	Hypoxieanpassung, Angiogenese, Glukosemetabolismus
VEGFA	Angiogenese, Erythropoese

Tab. II: Untersuchte Gene mit ausgewählten Funktionen

Das Haushalts-Gen β -Aktin wurde als Standard zur Normalisierung des „Crossing Points“ verwendet, da GAPDH durch Hypoxie beeinflusst wird. Bei β -Aktin konnte in unseren PDL-Zellen keine Regulation durch Hypoxie festgestellt werden. Bei jeder Reaktion diente Wasser an Stelle von cDNA als Negativ-Kontrolle. Die relative differenzielle Genexpression konnte nach der Pfaffl-Methode berechnet (Pfaffl, 2001). Die Primer-Effizienzen wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die PCR-Produkte wurden schließlich auf ein Agarose-Gel aufgetragen und hinsichtlich Bandenanzahl und –größe optimiert.

Tabelle II zeigt die untersuchten Gene und ausgewählte Funktionen bzw. Beteiligungen der zugehörigen Proteine.

Die QuantiTect Primer Assays und auch die selbst gestalteten Primer liefen alle mit dem gleichen PCR-Programm (**Tab. III**):

Schritt	Zeit	Temperatur
Enzym-Aktivierung	10 min	95 °C
Denaturierung	15 sec	95 °C
Annealing und Extension	45 sec	60 °C

Tab. III: Programm für die Echtzeit-PCR

Die PCR lief 40 Zyklen, und daran anschließend erfolgte die Ermittlung der spezifischen Schmelzkurven für die einzelnen Produkte.

2.4.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden Agarosegele gefertigt, die 2 % w/v Agarose in TBE-Puffer enthielten. Zu 50 ml erhitztem, homogenem Agarosegel sind 1 bis 2 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, München) gegeben worden. Allen Proben wurde 6-fach konzentrierter Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerol) zugesetzt, bevor sie auf das Gel geladen wurden. Die Agarose war von Promega (Mannheim), die Elektrophoresekammer (MINI SUBTM DNA CELL) und die Stromversorgung (PowerPac Basic) von Bio-Rad. Die Gele wurden unter UV-Licht im ChemiDoc XRS

System (Bio-Rad, München) mit der zugehörigen Software „QuantityOne“ ausgewertet.

2.4.5 IGF1 ELISA

Für die Durchführung des IGF1 ELISA wurde das DuoSet ELISA Development System (R&D, Minneapolis, USA) verwendet. Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates mit MaxiSorp-Oberfläche (hohe Affinität zu Proteinen mit hydrophilen als auch hydrophoben Domänen) und flachem Boden wurden mit einer Fänger-Antikörper-Lösung (4 µg/ml in PBS; 100 µl/Well) befüllt, mit Klebefolie versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgesaugt und dreimal mit jeweils 400 µl Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,4) pro Well gewaschen. Nach dem letzten Waschen erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindestellen mit 5 % Tween® 20 in PBS bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde. Daran anschließend wurden drei weitere Waschschritte (je 400 µl/Well) durchgeführt. Nun wurden die Proben und Standards (0 bis 2000 ng/ml, verdünnt in Blockierungslösung) mit jeweils 100 µl/Well pipettiert, die Platte versiegelt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen erfolgten erneut drei Waschschritte (je 400 µl/Well) und anschließend eine zwei-stündige Inkubation mit biotinyliertem Detektions-Antikörper (150 ng/ml in Blockierungslösung, versiegelte Platte, lichtgeschützt) bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem drei-maligen Waschen wurden 100 µl pro Well Streptavidin-HRP-Konjugat zugegeben und lichtgeschützt für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei letzte Waschschritte mit Absaugen nach dem letzten Schritt. Für die Enzymreaktion wurden 100 µl pro Well ABTS-Substratlösung (Sigma-Aldrich, München) zugegeben und lichtgeschützt für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbentwicklung wurde bei einer Wellenlänge von 415 nm am ELISA-Reader (BIO-RAD, München) gemessen. Nach dem Stoppen mit einer 1-prozentigen SDS-Lösung konnte die gleiche Wellenlänge genutzt werden.

IGF1 ist in Zellkulturüberständen an im Überschuss vorkommenden Bindungsproteinen gebunden und dissoziiert nur sehr langsam. Es ist in gebundenem Zustand nicht oder nur unzureichend für die Antikörper zugänglich. Es sind verschiedene Methoden bekannt, dieses Problem zu lösen. Hier kommen z.B.

die Ausschlusschromatografie unter sauren Bedingungen, Festphasenextraktion und die Säure-Alkohol-Extraktion zum Einsatz (Daughaday et al., 1980, 1987; Daughaday and Rotwein, 1989; Breier et al., 1991). Ein weiteres Problem ist die Vorverdünnung der Proben und die Erhaltung des gelösten IGF1. In dieser Arbeit wurden die Proben mit Glycin-HCl (pH 2,5, Endkonzentration 50 mM) angesäuert, um IGF1 von den Bindungsproteinen zu trennen. Danach wurden diese Proben entweder direkt aufgetragen und wieder mit Tris (Endkonzentration 50 mM) neutralisiert oder mit einem hohen Überschuss an IGF2 versetzt, gefolgt von einer Neutralisation und Auftragen auf die Platte. Weiterhin wurden Proben angesäuert und durch eine Molecular Weight Cut-Off-Säule (MWCO 10 kDa, Carl-Roth, Karlsruhe) für 5 Minuten zentrifugiert, wobei die Bindungsproteine zurückbleiben sollten. Danach wurden die Proben neutralisiert und aufgetragen.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe von Student's *t*-Test, one-way ANOVA, two-way ANOVA, gefolgt von Bonferroni post-Tests (GraphPad Prism 4 Software, San Diego, USA) ermittelt. Die Darstellungen zeigen den jeweiligen Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung. Unterschiede mit $p > 0,05$ werden als nicht signifikant, mit $p < 0,05$ als signifikant (*), mit $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) als hoch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der PDL-Zellen

3.1.1 Zellmorphologie

Die PDL-Zellen zeigten ein Fibroblasten-typisches Aussehen mit vielen irregulären zytoplasmatischen Fortsätzen (**Abb. 14A**). Gut zu erkennen waren auch die großen ovalen Zellkerne, besonders nach DAPI-Färbung von fixierten Zellen (**Abb. 14B**).

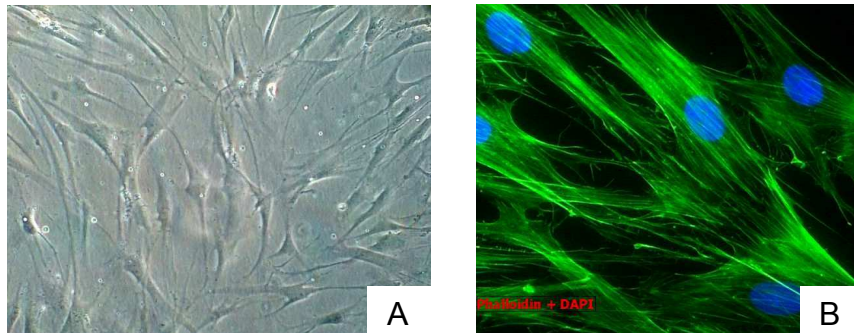


Abb. 14: Zellkultur, gewonnen aus parodontalem Ligament

(A) PDL-Zellen in Passage 5 unter dem Durchlichtmikroskop, Vergrößerung 150x

(B) PDL-Zellen in Passage 5 im Fluoreszenzmikroskop, der Zellkern wurde mit DAPI markiert (blau), F-Aktin wurde mit Phalloidin-FITC dargestellt (grün), Vergrößerung 400x

3.1.2 Grundexpression ausgewählter Gene

Zusätzlich wurden die Zellen hinsichtlich ihrer basalen Expression verschiedener Gene im Verhältnis zur β -Aktin-Expression untersucht (Tab IV). Die Cadherine CDH2 und CDH11 wurden bei präkonfluenten und konfluenten PDL-Zellkulturen stark exprimiert. Die stärkste Expression zeigte der mesenchymale Marker S100A4. Die osteoblastären Marker Osteopontin und Osteocalcin waren relativ schwach exprimiert. Die Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 wurden in konfluenten Zellen weniger stark exprimiert. Von den IGF-Bindungsproteinen waren alle bis auf das IGFBP-1 stark exprimiert. Dieses wurde nur sehr schwach exprimiert. Bei CDH2,

CDH11, Periostin und IGFBP-1 erfolgte eine Steigerung der Expression mit zunehmender Konfluenz. Bei Osteopontin, ID1, IGFBP-3 und IGFBP-5 war hingegen eine verminderte Expression zu erkennen.

	Mittelwert $2^{-\Delta\text{dCT}}$	
	präkonfluent	konfluent
CDH2	2,02E-03	5,34E-03
CDH11	9,96E-03	1,62E-02
Osteocalcin	4,40E-04	3,11E-04
Osteopontin	4,63E-05	2,57E-05
Periostin	1,26E-04	2,90E-04
S100A4	2,87E-01	2,59E-01
ID1	5,34E-03	5,81E-04
ID2	4,98E-03	3,52E-03
IGFBP-1	2,61E-06	2,66E-05
IGFBP-2	3,17E-03	2,32E-03
IGFBP-3	1,73E-02	9,62E-03
IGFBP-4	1,23E-02	1,41E-02
IGFBP-5	3,59E-02	2,32E-03
IGFBP-6	6,57E-03	5,52E-03

Tab. IV: Basale Genexpression im Verhältnis zu β -Aktin

Dargestellt sind die Verhältnisse der mRNA-Menge der untersuchten Gene zu der von β -Aktin;

$2^{-\Delta\text{dCT}}$ bedeutet $2^{-(\text{Ct-Wert}_{\text{Gen}} - \text{Ct-Wert}_{\text{Aktin}})}$ und repräsentiert das Verhältnis der jeweiligen mRNA-Menge zur Menge an Aktin-mRNA

3.1.3 Messung des Sauerstoffverbrauchs von PDL-Zellen

Die Resultate (**Abb. 15**) zeigten, dass die Zellzahl fast linear mit dem Sauerstoffverbrauch korreliert. Es waren relativ große Unterschiede zwischen Zellen von verschiedenen Spendern zu beobachten. Nach der Normierung auf die Zelllinien-spezifische Messung nach 2 Stunden wird aber deutlich, dass die Stärke des Effekts relativ konstant ist. 50 % konfluente Zellen verbrauchten demnach etwa halb so viel Sauerstoff wie konfluente Zellen. Bei den zellfreien Kontrollen konnte man bei 21% Sauerstoff im Inkubationsgas einen Sauerstoffgehalt von etwas mehr als 18% am Boden der Wells feststellen. Generell kann man sagen, dass PDL-Zellen im Vergleich mit anderen Zelllinien (z.B. HaCat oder Tumorzellen) einen relativ geringen Verbrauch an Sauerstoff besitzen.

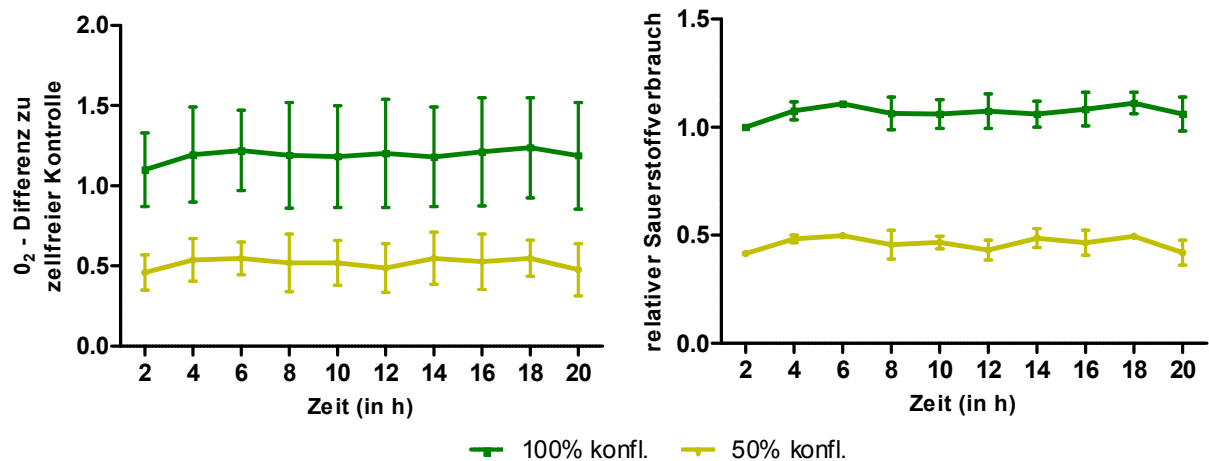


Abb. 15: Zellzahlabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von PDL-Zellen unter normoxischen Bedingungen

In der linken Graphik ist die Differenz des gemessenen O₂-Anteils (in %) am Boden der Zellkultur zu dem am Boden der zellfreien Kontrolle gemessenen dargestellt. Im rechten Teil wird der relative Sauerstoffverbrauch im Vergleich mit der Messung nach 2h bei 100% konfluenten Zellen gezeigt. Hier wurden alle Werte einer Zelllinie auf die zugehörige Messung nach 2h normiert.

Eine weitere Frage war, inwiefern sich der Sauerstoffverbrauch unter den einzelnen Stimulationen mit IGF1 und IL-1 β , bzw. in Kombination, verändert. Hierbei wurden folgende Ergebnisse ermittelt (**Abb.16**).

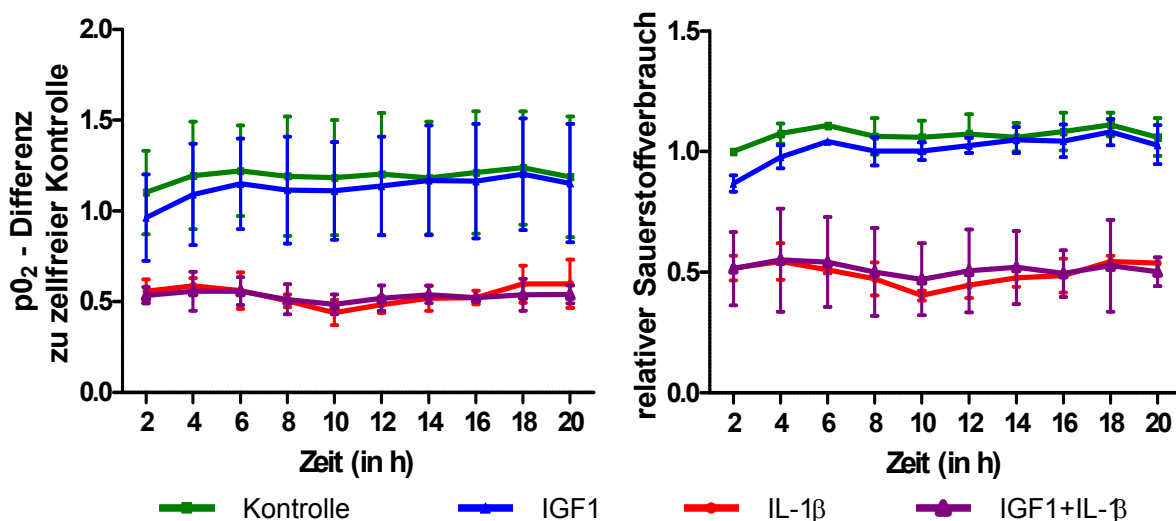


Abb. 16: Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von Stimulation mit IGF1 und IL-1 β

In der linken Graphik ist die Differenz des gemessenen O₂-Anteils (in %) am Boden der Zellkultur zu dem am Boden der zellfreien Kontrolle gemessenen dargestellt. Im rechten Teil wird der relative Sauerstoffverbrauch im Vergleich mit der Messung nach 2h bei 100% konfluenten Zellen gezeigt. Alle Werte einer Zelllinie wurden auf die zugehörige Messung nach 2h normiert.

Anhand dieser Daten ist eine deutliche Reduktion des Sauerstoffverbrauchs unter Stimulation mit IL-1 β festzustellen. Dieser Effekt tritt bereits unmittelbar nach der Stimulation auf. Das Niveau des Sauerstoffverbrauchs unter inflammatorischen Bedingungen ist im Mittel also etwa halb so hoch wie ohne Entzündung. IGF1 scheint keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch auszuüben und kann auch den Effekt von IL-1 β nicht umkehren.

Auch hier gibt es wieder teils relativ große, individuelle Unterschiede, welche allerdings nach der Normierung auf die Werte bei 2h keinen Einfluss auf den beobachteten Gesamteffekt haben. Der minimale Sauerstoffverbrauch von PDL-Zellen liegt demnach bei etwa 0,5 %.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Hypoxieversuche mit 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas durchgeführt.

3.2 Stimulationsversuche

3.2.1 Nachweis von HIF-1 α mittels Immunofluoreszenz

Um zu zeigen, dass unter 0,5% O₂ im Inkubationsgas ausreichend ist, um hypoxische Verhältnisse zu schaffen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von HIF-1 α durchgeführt.

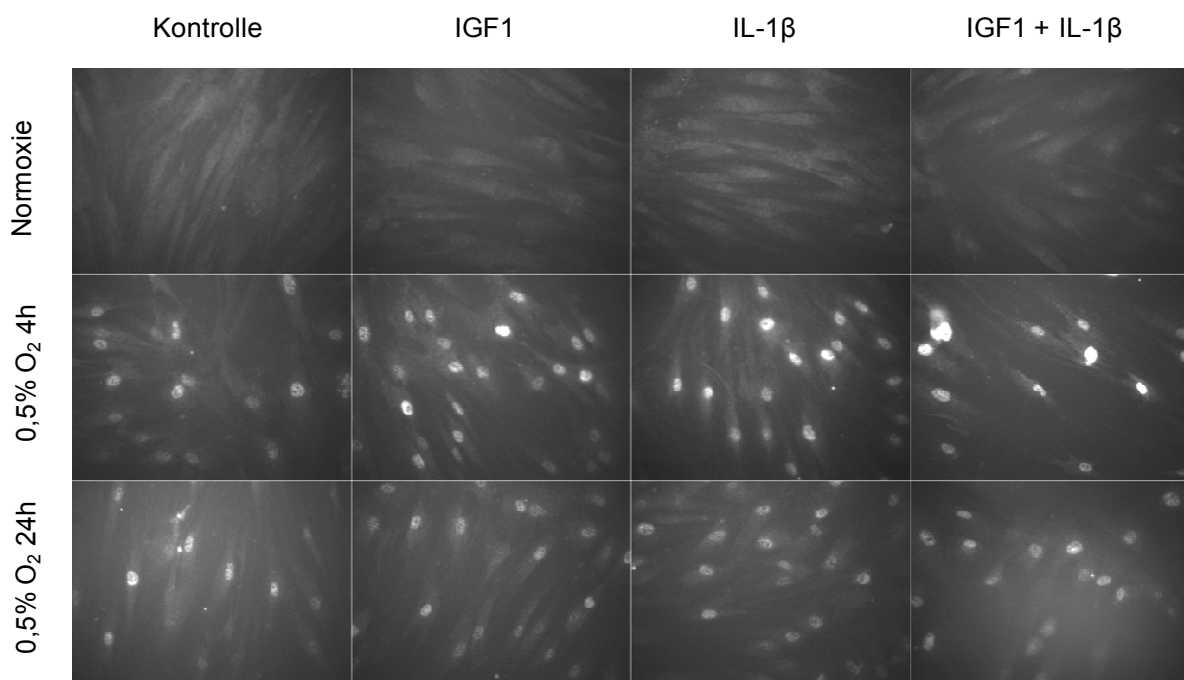


Abb. 17: Verteilung von HIF-1 α unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden ein monoklonaler anti-HIF-1 α Antikörper (Maus) und ein Cy3-gekoppelter anti-Maus Antikörper (Ziege) verwendet. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 400x (40x Objektiv, Zeiss, Jena) aufgenommen.

Auf den Bildern in **Abbildung 17** wird deutlich, dass HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen diffus im Zytoplasma verteilt war und insgesamt nur ein schwaches Signal zeigte. Nach 4 h unter 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas zeigte sich eine Translokation von HIF-1 α in den Nukleus. Bei der gleichzeitigen Stimulation mit IL-1 β oder auch IGF1 lag insgesamt ein stärkeres Signal von HIF-1 α vor als bei der unstimulierten Kontrolle. Auch nach 24h unter 0,5 % Sauerstoff war HIF-1 α deutlich im Kern der Zellen zu erkennen. Allerdings war das Signal ein wenig schwächer als

nach 4h. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HIF-1 α unter den beschriebenen Bedingungen in den Nukleus transloziert wird.

Die 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas sind ausreichend, um echte Hypoxie auf zellulärer Ebene zu vermitteln.

3.2.2 Proliferations-Tests

3.2.2.1 BrdU Assay

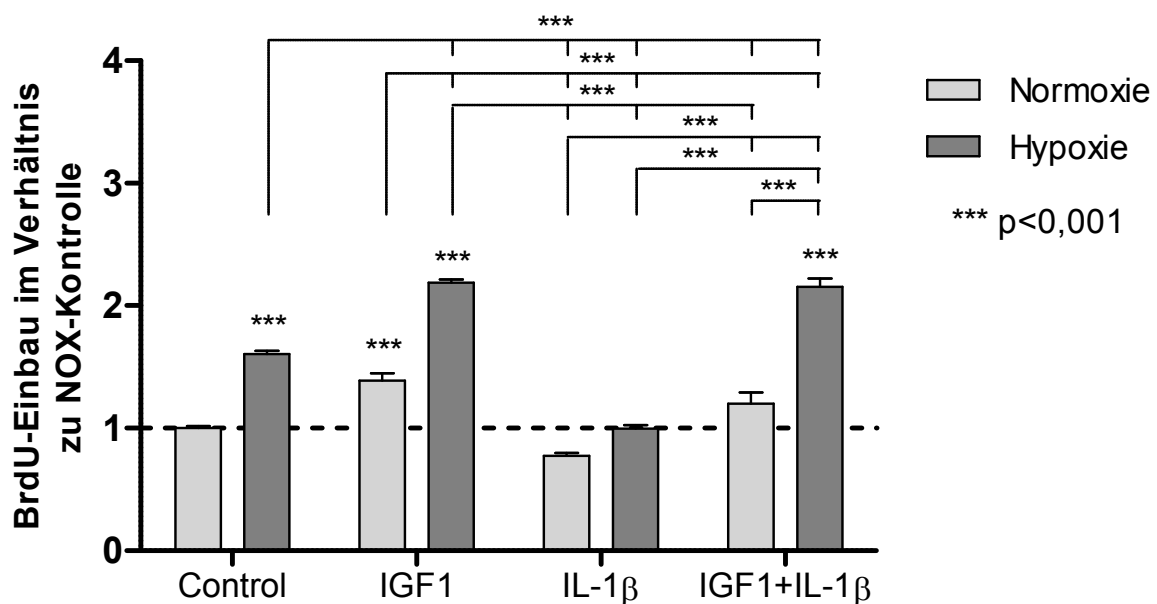


Abb. 18: BrdU-Assay nach 24h Inkubation mit IGF1 und IL-1 β

Dargestellt sind die gemessenen Absorptionen unter den einzelnen Stimulationen im Verhältnis zur unstimulierten normoxischen Kontrolle. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

Die Grafik in **Abbildung 18** zeigt den BrdU-Einbau unter Stimulation mit IGF1 und IL-1 β und Hypoxie im Verhältnis zur unstimulierten normoxischen Kontrolle. Unter Hypoxie wurde mehr BrdU in neusynthetisierte DNA eingebaut als bei der normoxischen Kontrolle. Auch eine Stimulation mit IGF1 sorgte für eine gesteigerte Proliferation, welche unter zusätzlicher Hypoxie noch gesteigert war. IL-1 β sorgte unter Normoxie tendenziell zu einer Abnahme der Proliferation, unter hypoxischen Bedingungen war der IL-1 β -Effekt signifikant. Bei Doppelstimulation mit IGF1 und IL-

IL-1 β wurde der Effekt unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen vollständig aufgehoben. Dabei wurden in etwa die gleichen Werte erreicht wie bei der jeweils nur mit IGF1 stimulierten Kontrolle.

3.2.2.2 WST-1 Assay

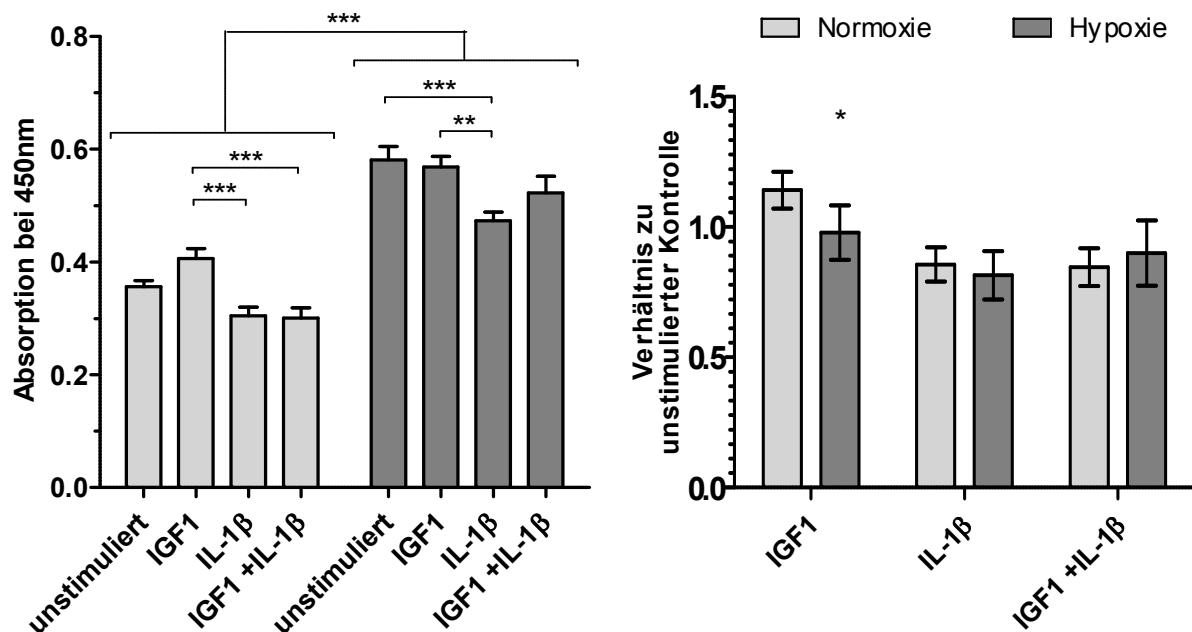


Abb. 19: WST-1 Assay nach 24h Inkubation mit IGF1 und IL-1 β

Im linken Teil ist die gemessene totale Absorption des gebildeten Formazans dargestellt. Im rechten Teil sind die Verhältnisse der Absorptionen von stimulierten (IGF1, IL-1 β) zu unstimulierten Proben als Vergleich zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen gezeigt. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

In **Abbildung 19** wird die unterschiedliche Formazanbildung unter den verschiedenen Stimulationen dargestellt. Unter Einfluss von IL-1 β war eine Abnahme der Proliferation unter normoxischen als auch unter hypoxischen Zuständen in gleichem Maße zu sehen. Der Effekt einer kombinierten Gabe von IGF1 und IL-1 β war unter beiden Bedingungen gleich. Im Vergleich mit den unstimulierten Kontrollen konnte hier eine leicht verminderte Proliferation beobachtet werden. Unter IGF1-Einfluss erfolgte in der Normoxie eine Steigerung der Proliferation, welche bei Hypoxie ausblieb.

3.2.3 Wundheilungsexperimente

Abbildung 20 zeigt beispielhaft die erzeugten „Wunden“ und die Auffüllung unter den verschiedenen Stimulationen.

Die „Wunde“ wuchs unter IGF1-Therapie am schnellsten zu. Unter IL-1 β erfolgte keine bzw. nur eine sehr schwache Heilung der Wunde. Bei kombinatorischer Gabe von IGF1 und IL-1 β wurden die negativen Effekte von IL-1 β neutralisiert.

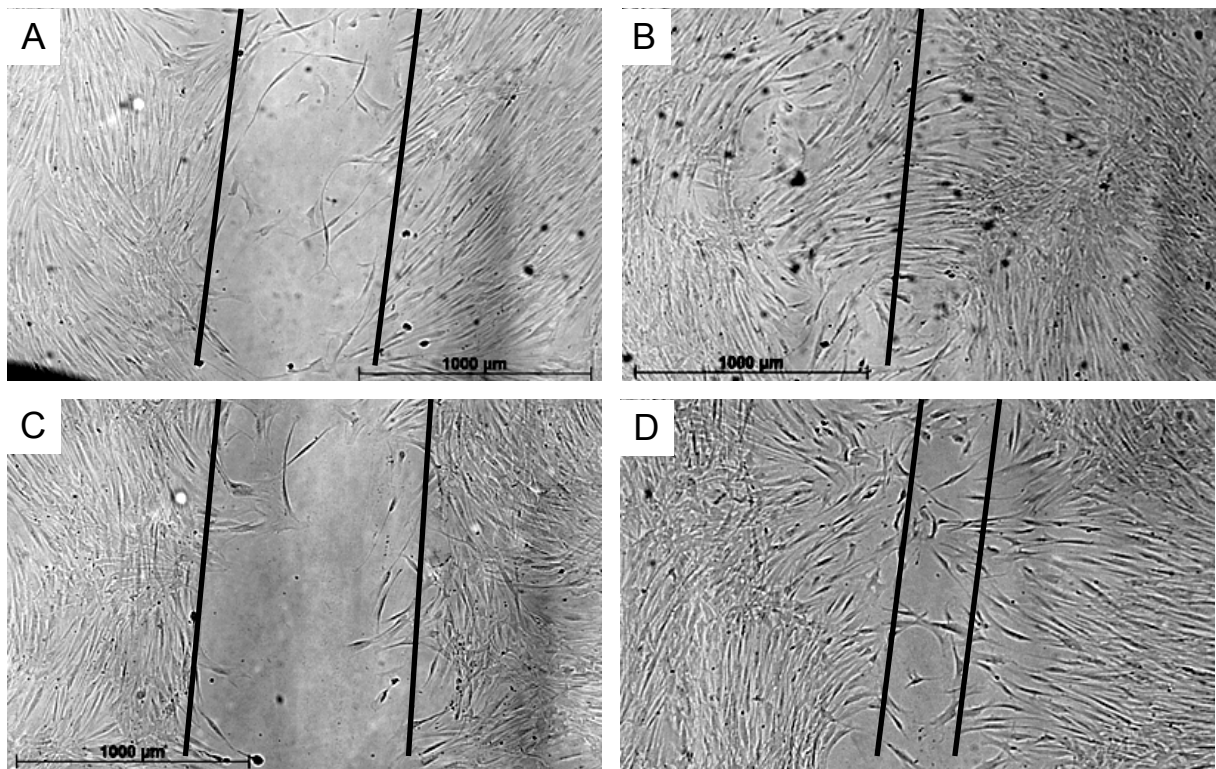


Abb. 20: Wundheilung in konfluenten PDL-Zellen unter Einfluss von IGF1 und IL-1 β

Dargestellt sind „verwundete“ PDL-Zellkulturen, welche über 3 Tage mit 10 nM IGF1 und/oder 60 pM IL-1 β inkubiert wurden. (A) Kontrolle, (B) IGF1, (C) IL-1 β , (D) IGF1 und IL-1 β zusammen; Vergrößerung 50x

In **Abbildung 21** ist dargestellt, welchen Einfluss die oben genannten Faktoren auf die Regeneration von „Wunden“ in der Kultur von PDL-Zellen hatten. In der Graphik wird deutlich, dass die Wundheilung durch IGF1 positiv, und durch IL-1 β negativ beeinflusst wurde. IGF1 zeigte bei kombinierter Stimulation mit IL-1 β einen kompletten Ausgleich der negativen IL-1 β -Wirkung. Im Vergleich zu den unstimulierten Proben war auch hier die Wundfüllung gefördert. Zwischen Normoxie und Hypoxie bestehen innerhalb der ersten 48h keine Unterschiede.

Erst später nach 72 h zeigten sich bei den unstimulierten Hypoxie-Proben als auch bei den mit IGF1 und IL-1 β in Kombination behandelten Proben unter Hypoxie etwas stärkere Zuwächse.

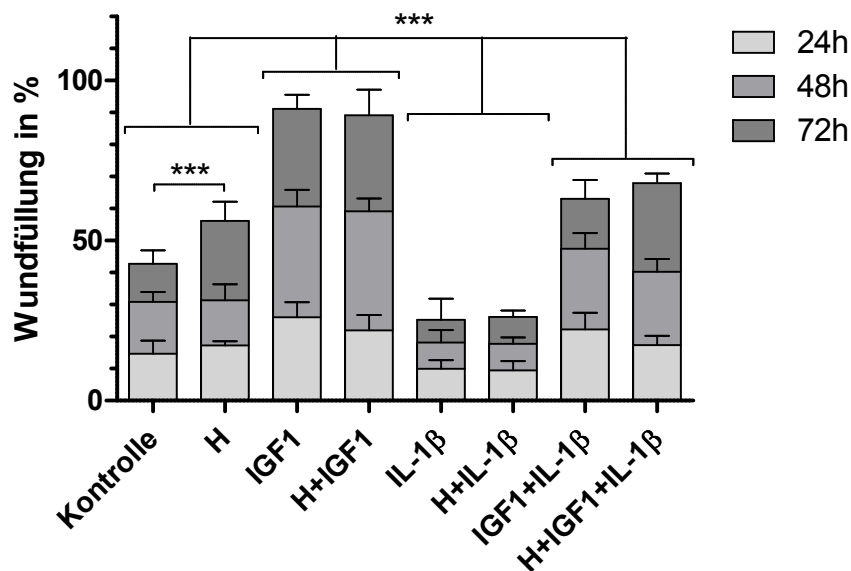


Abb. 21: Wundfüllung in PDL-Zellkulturen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Dargestellt ist die jeweilige Füllrate der zugefügten „Wunden“ unter den verschiedenen Bedingungen. Außerdem wird der Zuwachs innerhalb von jeweils 24 h gezeigt. Die angezeigten signifikanten Änderungen (***) beziehen sich auf die Endwerte nach 72 h.

3.2.4 Differenzielle Genexpression in PDL-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von IGF1 unter hypoxischen und inflammatorischen Verhältnissen wurde die Genexpression von Teilen des IGF-Systems, Differenzierungsmarkern und –inhibitoren, pro-inflammatorischer Zytokine sowie angiogener Faktoren untersucht. In Tabelle II (siehe **Abschnitt 2.4.4.3**) sind die untersuchten Gene dargestellt.

3.2.4.1 Test der selbst designten Primer

Abbildung 22 zeigt ein Agarosegel, auf dem die PCR-Produkte der selbst designten Primer aufgetragen wurden, um zu prüfen, ob jeweils nur eine Bande entsteht.

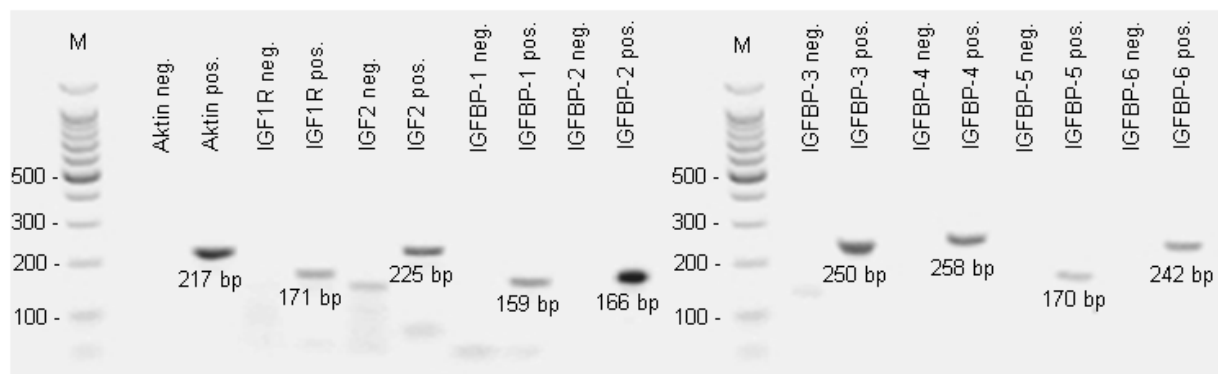


Abb. 22: Agarosegelelektrophorese der entstandenen PCR-Produkte (eigene Primer)

Aufgetragen wurden die PCR-Produkte der mit den selbst gestalteten Primern durchgeführten PCRs. Diese PCRs wurden alle mit dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Amplifikation lief über 50 Zyklen. M – Marker (siehe **Abschnitt 2.1.3**).

3.2.4.2 Einfluss von IGF1, IL-1 β und Hypoxie auf die Differenzierung von PDL-Zellen

Tabelle V gibt eine Übersicht über die mRNA-Expression verschiedener Differenzierungsmarker und der Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2.

Gen/Stimulation	Normoxie			
	IGF1	IL-1 β	IL-1 β + IGF1	Hypoxie
N-Cadherin	→	5x ↑ (*)	2x ↑ (***)	→
OB-Cadherin	→	3x ↑ (**)	2x ↑ (***)	3x ↑ (***)
Osteocalcin	2x ↓ (***)	2x ↑ (***)	2x ↓ (***)	7x ↑ (***) 2x ↑ (**)
Osteopontin	→	2x ↓ (***)	4x ↓ (***)	2x ↓ (**)
Periostin	2x ↑ (***)	2x ↓ (***)	2x ↓ (*)	→
S100A4	→	2x ↓ (*)	2x ↓ (***)	4x ↑ (*)
ID1	2x ↓ (**)	2x ↓ (***)	4x ↓ (***)	2x ↑ (**) 4x ↓ (***)
ID2	2x ↓ (***)	2x ↓ (*)	4x ↓ (***)	4x ↑ (**) 2x ↓ (**)
↑ erhöhte Expression; ↓ verringerte Expression; → unveränderte Expression				

Tab. V: Differenzierungsmarker unter normoxischen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden außerdem unter 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas kultiviert. Normiert wurde auf die entsprechenden unstimulierten normoxischen Kontrollen. Diese Tabelle zeigt eine Übersicht über die Expressionsänderungen ohne Beachtung der Inkubationszeit. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001

Unter Stimulation mit IGF1 sank die Expression von Osteocalcin um den Faktor 2. Die Expression von Periostin stieg bei langer Stimulation (hier 72 h) um den Faktor 2 an. Die Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 wurden nur halb so stark exprimiert wie bei der unstimulierten Kontrolle. Unter Stimulation mit IL-1 β erfolgte eine Hochregulation von N- und OB-Cadherin sowie Osteocalcin. Allerdings wurden Osteopontin, Periostin und S100A4 bei langer Stimulation (hier 72 h) um den Faktor 2 herunterreguliert. Die Expression der Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 war bei Kurzzeitstimulationen um den Faktor 2 inhibiert. Bei einer kombinierten Gabe von IL-1 β und IGF1 war die Expression von N-Cadherin nur leicht erhöht. Die Expression von OB-Cadherin war 2-fach positiv, die von Periostin 2-fach negativ reguliert. Osteocalcin, wurde nach 8h und 24h um den Faktor 2 herunterreguliert, während die Expression von Osteopontin und S100A4 erst bei längerer Stimulation 2- bis 4-fach

abnahm. ID1 und ID2 wurden um den Faktor 4 herunterreguliert. Bei den mit Hypoxie behandelten Zellen erfolgte keine Beeinflussung der Expression von N-Cadherin. Die Expression von OB-Cadherin, Osteocalcin und S100A4 war positiv reguliert. Bei Osteopontin zeigte sich eine 2-fach negative Regulation. Auch bei den Differenzierungsinhibitoren wurde durch die Hypoxie zunächst eine Expressionssteigerung erzielt. Zu späteren Zeitpunkten war die Expression jedoch herunterreguliert. Besonders ID1 war hier noch etwas stärker nach unten reguliert als ID2. Periostin zeigte keine Regulation.

In Tabelle VI wird eine Übersicht der oben untersuchten Gene bei Stimulation mit IGF1 bzw. IL-1 β unter Hypoxie dargestellt.

Gen\Stimulation	Hypoxie		
	IGF1	IL-1 β	IGF1 + IL-1 β
N-Cadherin	→	2x ↑ (**)	2x ↑ (**)
OB-Cadherin	→	2x ↑ (*)	→
Osteocalcin	2x ↓ (***)	→	2x ↓ (**)
Osteopontin	→	2x ↓ (**)	3x ↑ (**)
Periostin	2x ↑ (***)	2x ↓ (*)	2x ↓ (**)
S100A4	→	2x ↓ (**)	2x ↓ (*)
ID1	2x ↓ (***)	16x ↓ (***)	16x ↓ (***)
ID2	2x ↓ (*)	2x ↓ (***)	2x ↓ (***)
↑ erhöhte Expression; ↓ verringerte Expression; → unveränderte Expression			

Tab. VI: Differenzierungsmarker unter hypoxischen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. Alle Zellen wurden unter 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas kultiviert. Normiert wurde alles auf die unstimulierten hypoxischen Kontrollen. Diese Tabelle zeigt eine Übersicht über die Expressionsänderungen ohne Beachtung der Inkubationszeit. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001

Auch unter hypoxischen Bedingungen blieb die Expression von N- und OB-Cadherin unter IGF1-Einfluss unbeeinflusst. Bei Osteocalcin, Osteopontin, Periostin und S100A4 war unter diesen Bedingungen das Expressionsmuster über die Zeit ähnlich wie bei den entsprechenden normoxischen Proben. Osteocalcin wurde 2-fach herunter-, Periostin dagegen bei längerer Stimulation 2-fach hochreguliert. Die Expression von Osteopontin und S100A4 blieb unverändert. ID1 wurde relativ früh (4 h), ID2 dagegen relativ spät (72 h) um den Faktor 2 herunterreguliert. Unter entzündlichen Verhältnissen, simuliert durch IL-1 β , wurden N- und OB-Cadherin

kurzzeitig um den Faktor 2 hochreguliert. Die Expression von Osteocalcin blieb unverändert. Osteopontin, Periostin und S100A4 wurden bei längerer Stimulation mit IL-1 β um das 2-Fache herunterreguliert. Die Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 waren früh (2 h, 4 h) herunterreguliert und passten sich danach allerdings schnell dem Kontrollniveau an. ID1 war hier 16-fach, ID2 2-fach negativ reguliert. Unter kombinierter Gabe von IL-1 β und IGF1 konnte eine 2-fache Steigerung der Expression von N-Cadherin beobachtet werden. OB-Cadherin blieb jedoch unverändert. Die Expression von Osteopontin stieg um das 3-Fache im Vergleich mit den unstimulierten, hypoxischen Kontrollen. Osteocalcin, Periostin und S100A4 wurden erst zu späten Zeitpunkten (48 bzw. 72 h) um den Faktor 2 herunterreguliert. ID1 wurde auch hier früh (2 h, 4 h) um den Faktor 16 herunterreguliert. ID2 war nach kurzer Stimulation (2 h, 4 h, 8 h) 2-fach negativ reguliert.

Abbildung 23 zeigt beispielhaft die Regulation der Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 nach 2-stündiger Inkubation mit IGF1, IL-1 β und Hypoxie

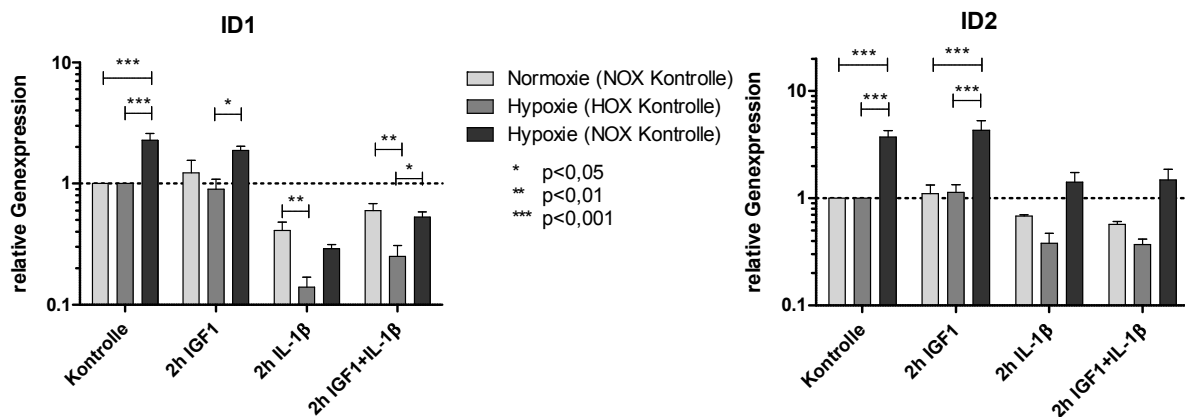


Abb. 23: Regulation von ID1 und ID2 unter verschiedenen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. „Normoxie (NOX Kontrolle)“ bedeutet hier, dass die Stimulationen unter normoxischen Bedingungen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden. „Hypoxie (HOX Kontrolle)“ bedeutet, die Stimulationen unter hypoxischen Bedingungen wurden auf die hypoxische Kontrolle normiert. „Hypoxie (NOX Kontrolle)“ heißt, dass die hypoxischen Stimulationen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden.

Aus **Abbildung 23** geht hervor, dass IGF1 nach 2 Stunden Inkubation keinen Einfluss auf die Expression von ID1 und ID2 hatte. Lediglich durch Hypoxie erfolgte eine Hochregulation der beiden Differenzierungsinhibitoren. Durch IL-1 β werden ID1 und ID2 unter Normoxie als auch unter Hypoxie im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle herunterreguliert.

In **Abbildung 24** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von Differenzierungsmarkern unter inflammatorischen Bedingungen dargestellt. Von IGF1 unbeeinflusste Gene werden nicht gezeigt.

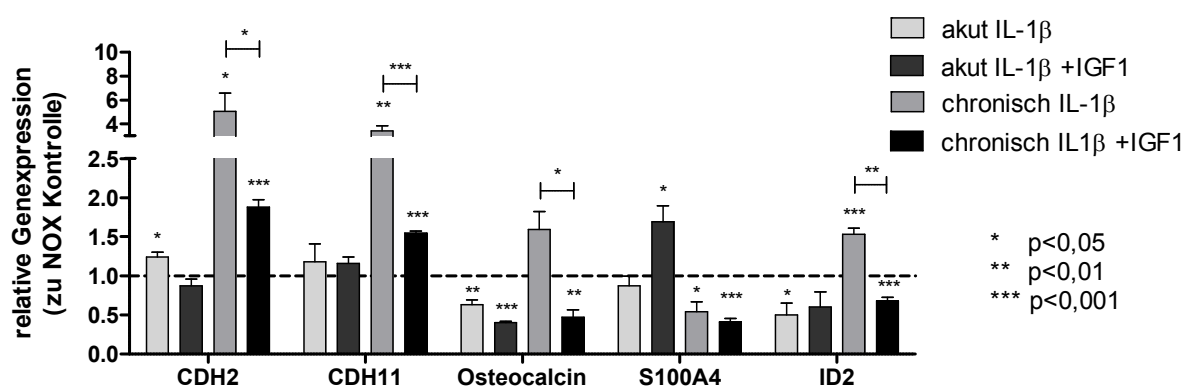


Abb. 24: Einfluss von IGF1 auf Differenzierungsmarker unter Entzündung

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit IL-1 β und IGF1 auftrat.

N-Cadherin (CDH2) wurde in der Anfangsphase der Stimulation mit IL-1 β positiv, Osteocalcin und ID2 hingegen negativ reguliert. Bei OB-Cadherin (CDH11) und S100A4 fand keine Regulation statt. Ein Einfluss von IGF1 war in der akuten Phase nicht zu erkennen. Lediglich bei S100A4 war ein tendenziell positiver Effekt von IGF1 sichtbar. In der chronischen Stimulation erfolgte eine Erhöhung der Expression von N- und OB-Cadherin sowie von ID2. Osteocalcin war tendenziell leicht erhöht. Es war ein negativer Einfluss von IGF1 auf die Regulation von N- und OB-Cadherin, Osteocalcin und ID2 zu erkennen.

In **Abbildung 25** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von Differenzierungsmarkern unter hypoxischen Bedingungen dargestellt. Von IGF1 unbeeinflusste Gene werden nicht gezeigt. In der Akutphase der Hypoxiebehandlung war die Expression von Osteopontin gesenkt, während die von ID2 erhöht war. Osteocalcin und ID1 waren unverändert. Unter Einfluss von IGF1 wurde ein negativer Effekt auf ID1 und ID2 festgestellt.

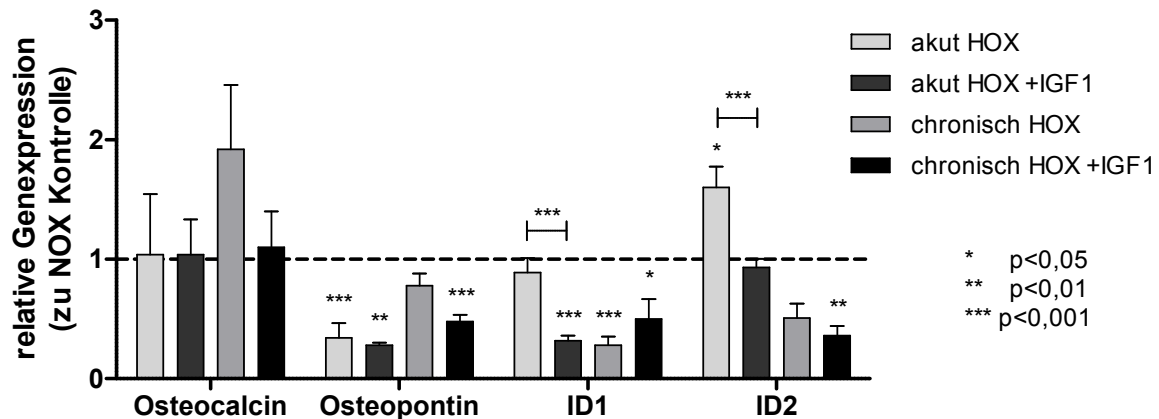


Abb. 25: Einfluss von IGF1 auf Differenzierungsmarker unter Hypoxie

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit Hypoxie (HOX) und IGF1 auftrat.

Unter chronischer Hypoxie waren eine tendenzielle Erhöhung der Osteocalcin-Expression sowie eine tendenzielle Inhibition der ID2-Expression erkennbar. Weiterhin war ID1 herunterreguliert. IGF1 hatte hier lediglich einen tendenziell negativen Einfluss auf Osteocalcin und Osteopontin.

In **Abbildung 26** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von Differenzierungsmarkern unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen in Kombination dargestellt. Von IGF1 unbeeinflusste Gene werden nicht gezeigt. Unter Hypoxie und inflammatorischen Bedingungen waren in der akuten Phase Osteopontin und ID2 herunterreguliert. Ein Einfluss von IGF1 zeigte sich nicht. In der chronischen Stimulation erfolgte lediglich eine Herunterregulation von Osteopontin. IGF1 hatte hier einen positiven Effekt auf die Osteopontin-Expression und einen tendenziell negativen Effekt auf die Expression von ID2.

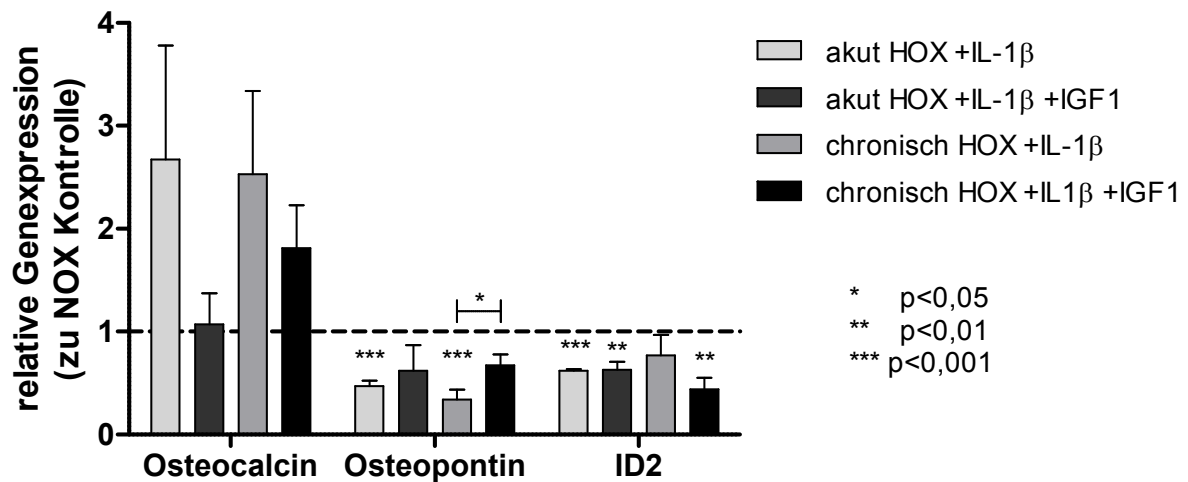


Abb. 26: Einfluss von IGF1 auf Differenzierungsmarker unter Hypoxie und Entzündung

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit Hypoxie (HOX), IL-1 β und IGF1 auftrat.

3.2.4.3 Einfluss von IGF1, IL-1 β und Hypoxie auf die Expression von Komponenten des IGF-Systems in PDL-Zellen

Tabelle VII gibt eine Übersicht über die mRNA-Expression von verschiedenen Komponenten des IGF-Systems.

Unter Stimulation mit IGF1 wurden IGF1 selbst um den Faktor 6, als auch der IGF1-Rezeptor und das IGF-Bindungsprotein 1 um den Faktor 2 herunterreguliert. Das IGF-Bindungsprotein 5 war 2-fach hochreguliert. Bei allen anderen Bindungsproteinen sowie dem Insulin-Rezeptor-Substrat 1 fand keine Regulation statt.

Unter Einfluss von IL-1 β waren deutlich mehr Veränderungen zu sehen. Hier wurde IGF1 nach 8 und 24 Stunden 10-fach hochreguliert. Auch die Expression von IGFBP-1, -2, -4 und -5 war positiv beeinflusst. Dabei erfolgte bei IGFBP-1 und IGFBP-2 eine 2- bzw. 3-fache Expressionssteigerung. Die Expression von IGFBP-4 erreichte relativ spät nach 48 Stunden den 4-fachen Wert der unstimulierten Kontrolle. Im Gegensatz dazu war die Expression von IGFBP-5 nach sehr kurzer Stimulation von 2 Stunden etwa um den Faktor 2 erhöht. Die Bindungsproteine IGFBP-3 (-2-fach) und IGFBP-6 (-3-fach) wurden nach 72 Stunden Inkubation mit IL-1 β herunterreguliert. Unter

kombinierter Stimulation mit IGF1 und IL-1 β wurden lediglich IGF1 selbst (4-fach) und das IGFBP-4 (2-fach) positiv reguliert. Alle anderen Bindungsproteine sowie IRS1 waren 2- bis 3-fach herunterreguliert.

Bei Kultivierung mit 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas wurde die Expression des IGF1-Rezeptors sowie der Bindungsproteine 2, 3, 5 als auch IRS1 nach kurzer Stimulation gesteigert. Bei IGF1R, IGFBP-2 normalisierte sich dieser Effekt sehr schnell wieder, bei den IGF-Bindungsproteinen 3 und 5 jedoch blieb die erhöhte Expression über einen etwas längeren Zeitraum erhalten. Die Expression von IGFBP-6 war nach 72 Stunden um den Faktor 3 positiv reguliert. Eine Regulation von IGFBP-4 erfolgte nicht. Die Expression von IGFBP-1 sank nach 4-stündiger Hypoxie um den Faktor 4, stieg danach jedoch wieder deutlich an und erreichte nach 72 Stunden eine 4-fache Steigerung.

	Normoxie			
Gen/Stimulation	IGF1	IL-1 β	IL-1 β + IGF1	Hypoxie
IGF1	6x \downarrow (**)	10x \uparrow (***)	4x \uparrow (**)	
IRS1	\rightarrow	4x \downarrow (***) 3x \uparrow (**)	2x \downarrow (***)	2x \uparrow (***)
IGF1R	2x \downarrow (***)	\rightarrow	2x \downarrow (***)	2x \uparrow (**)
IGFBP-1	2x \downarrow (***)	2x \uparrow (**)	3x \downarrow (***)	4x \downarrow (***) 4x \uparrow
IGFBP-2	\rightarrow	3x \uparrow (*)	3x \downarrow (***)	7x \uparrow
IGFBP-3	\rightarrow	2x \downarrow (**)	3x \downarrow (***)	4x \uparrow (***)
IGFBP-4	\rightarrow	4x \uparrow (***)	2x \uparrow (*)	\rightarrow
IGFBP-5	2x \uparrow (*)	2x \uparrow (*)	2x \downarrow (***)	10x \uparrow (***)
IGFBP-6	\rightarrow	3x \downarrow (***)	2x \downarrow (***)	3x \uparrow (*)
\uparrow erhöhte Expression; \downarrow verringerte Expression; \rightarrow unveränderte Expression				

Tab. VII: mRNA-Expression von IGF-Systemkomponenten unter normoxischen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus beiden stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden außerdem unter 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas kultiviert. Normiert wurde auf die entsprechenden unstimulierten normoxischen Kontrollen. Diese Tabelle zeigt eine Übersicht über die Expressionsänderungen ohne Beachtung der Inkubationszeit. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001

In Tabelle VIII wird eine Übersicht der gleichen Gene bei Stimulation mit IGF1 bzw. IL-1 β unter Hypoxie dargestellt. Bei der Stimulation mit IGF1 war unter hypoxischen Bedingungen ein ähnliches Expressionsprofil zu erkennen wie unter normoxischen Bedingungen. Der IGF1-Rezeptor und das Bindungsprotein 1 wurden nach 8 bis 24 Stunden Inkubation mit IGF1 um den Faktor 2 bzw. 3 herunterreguliert. Zusätzlich

war das IGFBP-4 nach 24 Stunden 2-fach negativ reguliert. Die Expression der anderen IGF-Bindungsproteine sowie IRS1 blieb unbeeinflusst.

Bei Stimulation mit IL-1 β wurden der IGF1-Rezeptor und IGFBP-2 unter hypoxischen Verhältnissen um das 2-Fache herunterreguliert. Dies passierte beim IGF1R nach einer Inkubation von 8 bis 24 Stunden, bei IGFBP-2 wesentlich früher nach 2 Stunden. Die Expression von IGFBP-1 wurde nach 2 Stunden um den Faktor 2 herunterreguliert. Nach 24 Stunden stieg sie allerdings wieder auf das 4-Fache der unstimulierten hypoxischen Kontrolle an. Die Expression der Bindungsproteine 3 und 4 war ab einer Inkubationszeit von 24 Stunden erhöht. Das Bindungsprotein 5 wurde ab einer Stimulationsdauer von 24 Stunden 2-fach hochreguliert. Die Expression von IGFBP-6 sank nach 72 Stunden um den Faktor 2. Die IRS1-Expression war nach 24 Stunden doppelt so hoch wie bei den unstimulierten hypoxischen Kontrollen.

Gen\Stimulation	Hypoxie		
	IGF1	IL-1 β	IGF1 + IL-1 β
IRS1	→	2x ↑ (***)	→
IGF1R	2x ↓ (***)	2x ↓ (***)	3x ↓ (***)
IGFBP-1	3x ↓ (***)	2x ↓ (***) 4x ↑ (**)	3x ↓ (***)
IGFBP-2	→	2x ↓ (**)	→
IGFBP-3	→	6x ↑ (***)	2x ↓ (***) 5x ↑ (**)
IGFBP-4	2x ↓ (*)	2x ↑ (**)	→
IGFBP-5	→	2x ↑ (**)	2x ↑ (*)
IGFBP-6	→	2x ↓ (***)	2x ↓ (**)
↑ erhöhte Expression; ↓ verringerte Expression; → unveränderte Expression			

Tab. VIII: mRNA-Expression von IGF-Systemkomponenten unter hypoxischen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. Alle Zellen wurden unter 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas kultiviert. Normiert wurde auf die entsprechenden unstimulierten hypoxischen Kontrollen. Diese Tabelle zeigt eine Übersicht über die Expressionsänderungen ohne Beachtung der Inkubationszeit. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001

Bei kombinierter Gabe von IL-1 β und IGF1 unter Hypoxie war eine 3-fach verminderte Expression des IGF1-Rezeptors zu erkennen. Das IGFBP-1 wurde nach 2-stündiger Inkubation 3-fach herunterreguliert. Die Expression von IGFBP-3 und -5 war nach 2 Stunden etwa halb so stark wie die der unstimulierten hypoxischen Kontrollen. Bei Bindungsprotein 3 stieg allerdings die Expression später wieder an und erreichte nach 72 Stunden das 5-Fache der unstimulierten Kontrollen. Bei

IGFBP-6 war die Expression nach 48 Stunden um den Faktor 2 gesenkt, die Bindungsproteine 2 und 4 sowie IRS1 zeigten keine Regulation.

In **Abbildung 27** wird beispielhaft die Regulation des IGF1-Rezeptors und des IGF-Bindungsproteins 3 nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation mit IGF1, IL-1 β und Hypoxie dargestellt. Die Expression des IGF1R war nach 24 Stunden Inkubation mit IGF1 auf die Hälfte reduziert. Unter hypoxischen Verhältnisse zeigte sich der gleiche Effekt. IL-1 β und gleichzeitige Hypoxie führten zu einer negativen Regulation des IGF1R, wobei die Einzelstimulationen keine Veränderungen zu den normoxischen Kontrollen zeigten. IGFBP-3 wurde nach 48 Stunden durch Hypoxie hochreguliert. Die Kombination von Hypoxie und IL-1 β führte zu einer deutlichen Expressionssteigerung von IGFBP-3. IGF1 hatte keinen Einfluss auf die Expression von IGFBP-3.

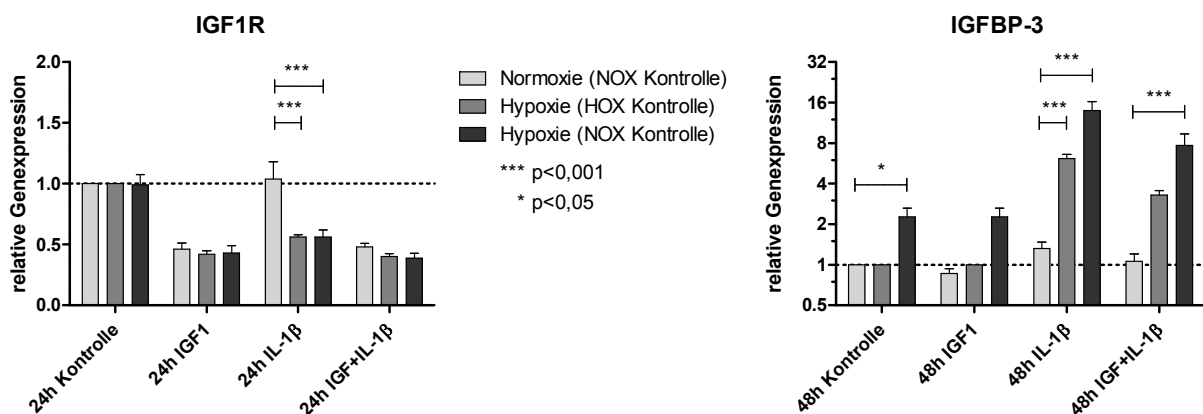


Abb. 27: Regulation von IGF1R und IGFBP-3 unter verschiedenen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. „Normoxie (NOX Kontrolle)“ bedeutet hier, dass die Stimulationen unter normoxischen Bedingungen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden. „Hypoxie (HOX Kontrolle)“ bedeutet, die Stimulationen unter hypoxischen Bedingungen wurden auf die hypoxische Kontrolle normiert. „Hypoxie (NOX Kontrolle)“ heißt, dass die hypoxischen Stimulationen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden.

In **Abbildung 28** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von Komponenten des IGF-Systems unter inflammatorischen Bedingungen dargestellt. Von IGF1 unbeeinflusste Gene werden nicht gezeigt. In der Akutphase der IL-1 β -Stimulation wurden IGF1R und IRS1 herunterreguliert. Die Expression der dargestellten Bindungsproteine war unverändert. Ein Einfluss von IGF1 konnte nur tendenziell für IGFBP-6 ermittelt werden.

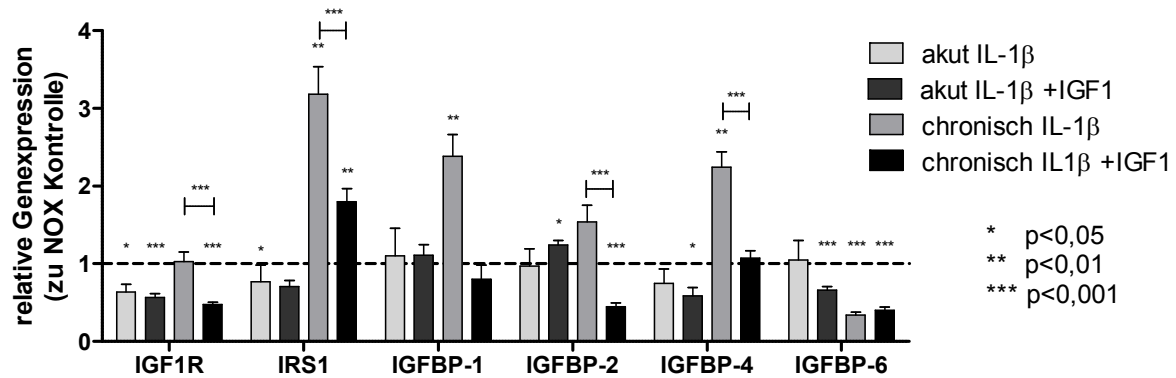


Abb. 28: Einfluss von IGF1 auf das IGF-System unter Entzündung

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit IL-1β und IGF1 auftrat.

Bei chronischer Stimulation waren IRS1, IGFBP-1 und -4 positiv und IGFBP-6 negativ reguliert. IGF1 hatte einen negativen Effekt auf IGF1R, IRS1, IGFBP-2 und IGFBP-4. Ein tendenziell negativer Einfluss von IGF1 war außerdem bei IGFBP-1 zu erkennen.

In **Abbildung 29** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von Komponenten des IGF-Systems unter hypoxischen Bedingungen dargestellt. Von IGF1 unbeeinflusste Gene werden nicht gezeigt.

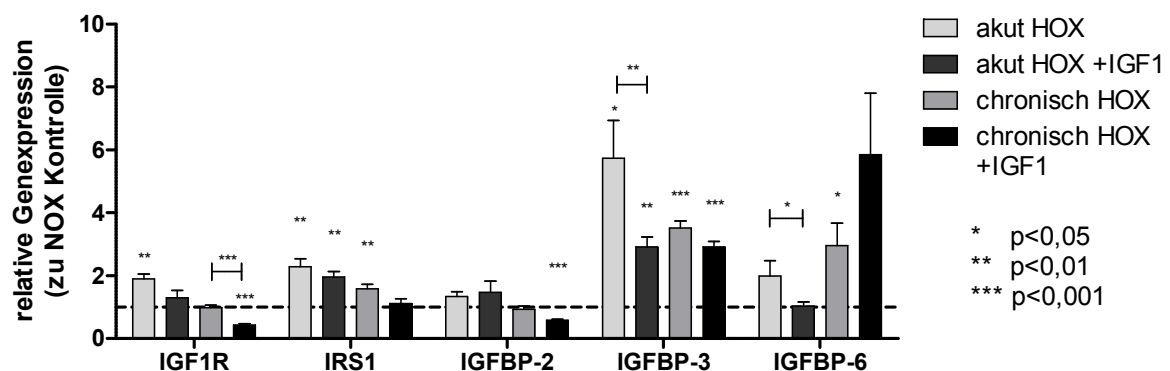


Abb. 29: Einfluss von IGF1 auf das IGF-System unter Hypoxie

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit Hypoxie (HOX) und IGF1 auftrat.

In der akuten Phase der hypoxischen Behandlung waren IGF1R, IRS1 und IGFBP-3 hochreguliert. IGF1 hatte einen inhibitorischen Einfluss auf die Expression von IGFBP-3 und -6. Die Expression der anderen Gene blieb unbeeinflusst. Unter chronischer Exposition mit IGF1 waren IRS1, IGFBP-3 und -6 hochreguliert. Die Expression des IGF1R wurde durch IGF1 negativ beeinflusst. Bei IGFBP-2 war tendenziell ein negativer Einfluss von IGF1 zu erkennen.

In **Abbildung 30** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von Komponenten des IGF-Systems unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen in Kombination dargestellt. Von IGF1 unbeeinflusste Gene werden nicht gezeigt.

Bei IRS1 und IGFBP-6 erfolgte während der akuten Behandlung mit Hypoxie und IL-1 β eine Expressionssteigerung. IGFBP-1 wurde hingegen herunterreguliert. Bei IGFBP-2 erfolgte keine Regulation. Ein Einfluss von IGF1 war nicht zu erkennen. Bei chronischer Stimulation waren IRS1 und IGFBP-1 hochreguliert. Die Bindungsproteine 2 und 6 blieben unverändert. Ein negativer Einfluss von IGF1 auf die Expression von IRS1 und IGFBP-2 war zu erkennen. Auf die Expression von IGFBP-6 wirkte IGF1 tendenziell positiv ein.

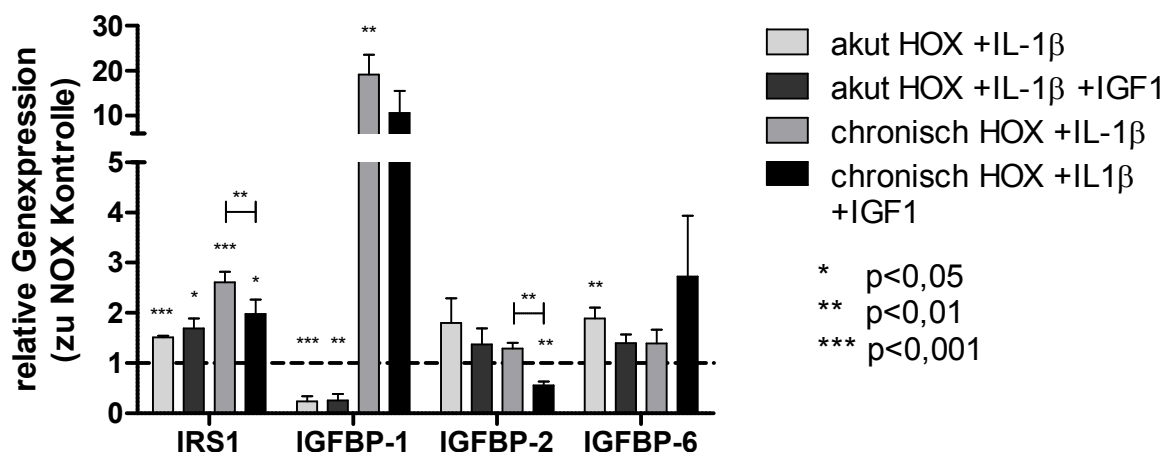


Abb. 30: Einfluss von IGF1 auf das IGF-System unter Hypoxie und Entzündung

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit Hypoxie (HOX), IL-1 β und IGF1 auftrat.

3.2.4.4 Einfluss von IGF1, IL-1 β und Hypoxie auf die Expression von HIF-1 α , VEGFA und Zytokinen

Tabelle IX gibt einen Überblick über die Genexpression von HIF-1 α , VEGFA, der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 sowie des anti-inflammatorischen IL-10.

Eine Stimulation mit IGF1 hatte einen relativ geringen Einfluss auf die Expression von IL-1 β . Dieses war hier um den Faktor 4 negativ reguliert. HIF-1 α zeigte keine Regulation. VEGFA zeigte nur 2 Stunden eine Expressionserhöhung auf das 2-Fache der unstimulierten Kontrollen. Die Expression von IL-6 war nach 24 Stunden auf halbem Niveau der Kontrolle.

IL-1 β sorgte für eine schnelle und starke Hochregulation seiner eigenen als auch der Expression von IL-6. HIF-1 α und VEGFA werden hier um den Faktor 3 bzw 2 positiv reguliert.

Gen/Stimulation	Normoxie			
	IGF1	IL-1 β	IL-1 β + IGF1	Hypoxie
IL-1 β	4x ↓ (***)	2000x ↑ (***)	2000x ↑ (**)	→
IL-6	2x ↓ (***)	600x ↑ (**)	350x ↑ (**)	8x ↑ (*)
HIF-1 α	→	3x ↑ (**)	2x ↑ (***)	2x ↑ (*)
VEGFA	2x ↑ (**)	2x ↑ (**)	3x ↑ (***)	3x ↑ (***)
↑ erhöhte Expression; ↓ verringerte Expression; → unveränderte Expression				

Tab. IX: mRNA-Expression ausgewählter Zytokine, HIF-1 α und VEGFA unter normoxischen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden außerdem unter 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas kultiviert. Normiert wurde auf die entsprechenden unstimulierten normoxischen Kontrollen. Diese Tabelle zeigt eine Übersicht über die Expressionsänderungen ohne Beachtung der Inkubationszeit. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001

Bei kombinierter Stimulation mit IL-1 β und IGF1 ergab sich ein ähnliches Bild. IL-1 β selbst und IL-6 wurden deutlich hochreguliert. Die Expression von VEGFA war sehr früh (2 h, 4 h) auf das 3-Fache hochreguliert, blieb danach aber auf dem Niveau der unstimulierten Kontrollen. Bei HIF-1 α war nach 48h eine Erhöhung der Expression um den Faktor 2 zu beobachten.

Unter Hypoxie (0,5% O₂) war die IL-1 β -Expression nach 24h 2-fach hochreguliert. IL-6 wurde schon zu frühen Zeitpunkten positiv reguliert (8-fach). Die Expression von

HIF-1 α war nach 4 Stunden auf das 2-Fache erhöht. Bei VEGFA wurde eine Expressionssteigerung auf das 3-Fache nach 8 Stunden Hypoxie festgestellt.

In Tabelle X ist eine Übersicht über die Expression der untersuchten Gene unter hypoxischen Bedingungen dargestellt.

Unter hypoxischen Bedingungen führte eine Stimulation mit IGF1 zu einer Expressionserhöhung von IL-6 nach 2 Stunden Inkubation. Die Expression von HIF-1 α war nach 72 Stunden um den Faktor 3 reduziert. Bei IL-1 β und VEGFA konnte keine Expressionsänderung festgestellt werden.

Bei einer Stimulation mit IL-1 β erfolgte auch unter hypoxischen Bedingungen eine starke Erhöhung der Genexpression von IL-1 β als auch IL-6, welche allerdings insgesamt ein wenig schwächer ausfiel als unter normoxischen Bedingungen. Die Expression von HIF-1 α (4-fach) und VEGFA (2-fach) war auch hier erhöht.

Gen\Stimulation	Hypoxie		
	IGF1	IL-1 β	IGF1 + IL-1 β
IL-1 β	→	700x \uparrow (**)	350x \uparrow (**)
IL-6	2x \uparrow (*)	250x \uparrow (***)	250x \uparrow (***)
HIF-1 α	3x \downarrow (***)	4x \uparrow (*)	4x \uparrow (*)
VEGFA	→	2x \uparrow (*)	3x \uparrow (***)
\uparrow erhöhte Expression; \downarrow verringerte Expression; → unveränderte Expression			

Tab. X: mRNA-Expression ausgewählter Zytokine, HIF-1 α und VEGFA unter hypoxischen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden außerdem unter 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas kultiviert. Normiert wurde auf die entsprechenden unstimulierten hypoxischen Kontrollen. Diese Tabelle zeigt eine Übersicht über die Expressionsänderungen ohne Beachtung der Inkubationszeit. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Unter kombinierter Stimulation war die Expression von IL-1 α und IL-6 noch deutlich erhöht. Die relative Expression von IL-1 β war insgesamt etwas schwächer als unter normoxischen Bedingungen, jedoch hielt sie sich über längere Zeit auf einem stabilen Niveau. Auch hier konnte eine Expressionssteigerung bei HIF-1 α (4-fach) und VEGFA (3-fach) beobachtet werden.

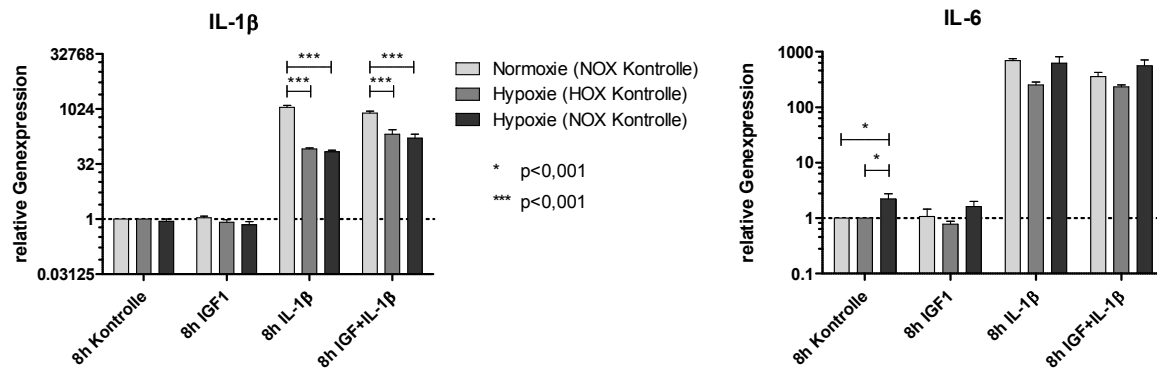


Abb. 31: Regulation von IL-1 β und IL-6 unter verschiedenen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. „Normoxie (NOX Kontrolle)“ bedeutet hier, dass die Stimulationen unter normoxischen Bedingungen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden. „Hypoxie (HOX Kontrolle)“ bedeutet, die Stimulationen unter hypoxischen Bedingungen wurden auf die hypoxische Kontrolle normiert. „Hypoxie (NOX Kontrolle)“ heißt, dass die hypoxischen Stimulationen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden.

Abbildung 31 zeigt beispielhaft die Regulation von IL-1 β und IL-6 nach 8-stündiger Inkubation mit IGF1, IL-1 β und Hypoxie.

Unter IL-1 β -Stimulation war die Expression beider Zytokine nach 8 Stunden deutlich gesteigert. Unter hypoxischen Umständen war bei der Expression von IL-1 β der Effekt schwächer als unter Normoxie. IL-6 wurde unter Hypoxie auf das 2-Fache hochreguliert. Eine Stimulation mit IGF1 zeigte keinen Effekt.

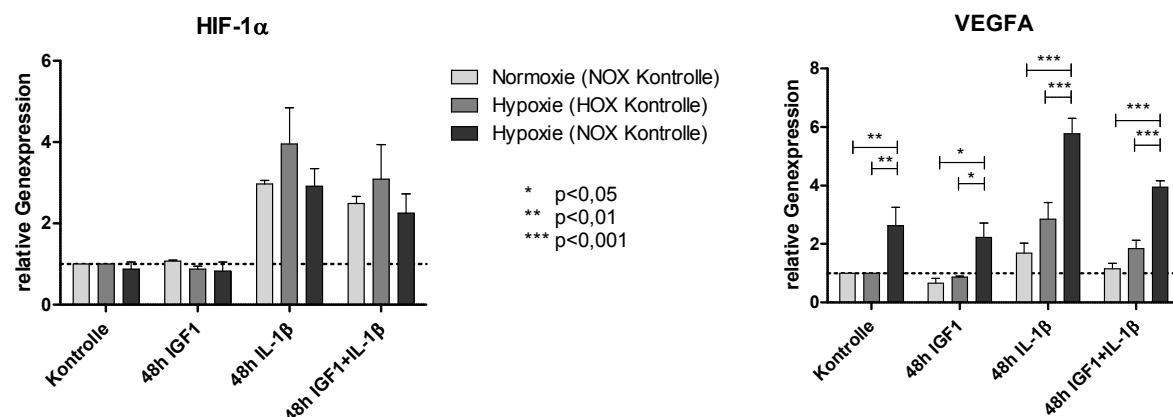


Abb. 32: Regulation von HIF-1 α und VEGFA unter verschiedenen Bedingungen

PDL-Zellen wurden mit 60 pM IL-1 β , 10 nM IGF1 und einer Kombination aus diesen beiden stimuliert. „Normoxie (NOX Kontrolle)“ bedeutet hier, dass die Stimulationen unter normoxischen Bedingungen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden. „Hypoxie (HOX Kontrolle)“ bedeutet, die Stimulationen unter hypoxischen Bedingungen wurden auf die hypoxische Kontrolle normiert. „Hypoxie (NOX Kontrolle)“ heißt, dass die hypoxischen Stimulationen auf die normoxische Kontrolle normiert wurden.

Abbildung 32 zeigt beispielhaft die Regulation von HIF-1 α und VEGFA nach 48-stündiger Inkubation mit IGF1, IL-1 β und Hypoxie.

IL-1 β führte unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen nach 48 Stunden zu einer 3-fach Zunahme der HIF-1 α -Expression. IGF1 und Hypoxie hatten hier keinen Einfluss. VEGFA wurde unter Hypoxie 5-fach hochreguliert. Auch IL-1 β führte hier zu einer Expressionssteigerung. In Kombination mit Hypoxie verstärkte sich der Effekt noch. IGF1 hatte auch hier keinen Einfluss auf die Expression von VEGFA.

In **Abbildung 33** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von Zytokinen und VEGFA unter inflammatorischen Bedingungen dargestellt. Unter Einfluss von IL-1 β wurden IL-1 β selbst, IL-6 und VEGFA in der akuten Phase der Stimulation hochreguliert. IGF1 zeigte bei den Interleukinen keinen Einfluss auf deren Regulation. Lediglich bei VEGFA war eine tendenzielle Expressionssteigerung durch IGF1 zu vermerken. In der chronischen Phase der Stimulation waren IL-1 β sowie IL-6 noch immer hochreguliert. Bei der Expression von IL-1 β zeigte sich ein negativer Einfluss von IGF1.

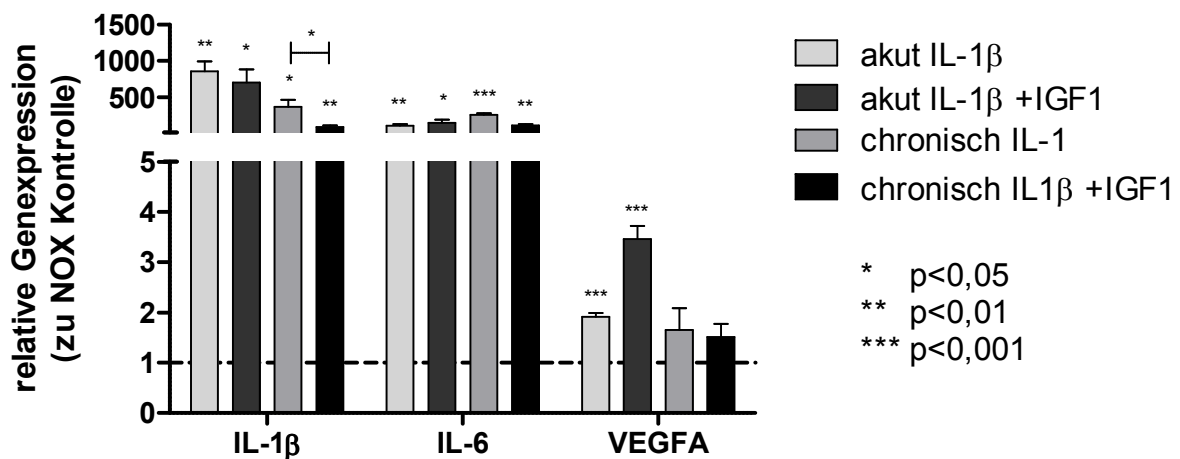


Abb. 33: Einfluss von IGF1 auf IL-1 β , IL-6 und VEGFA unter Entzündung

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit IL-1 β und IGF1 auftrat.

In **Abbildung 34** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von IL-6 und VEGFA unter hypoxischen Bedingungen dargestellt.

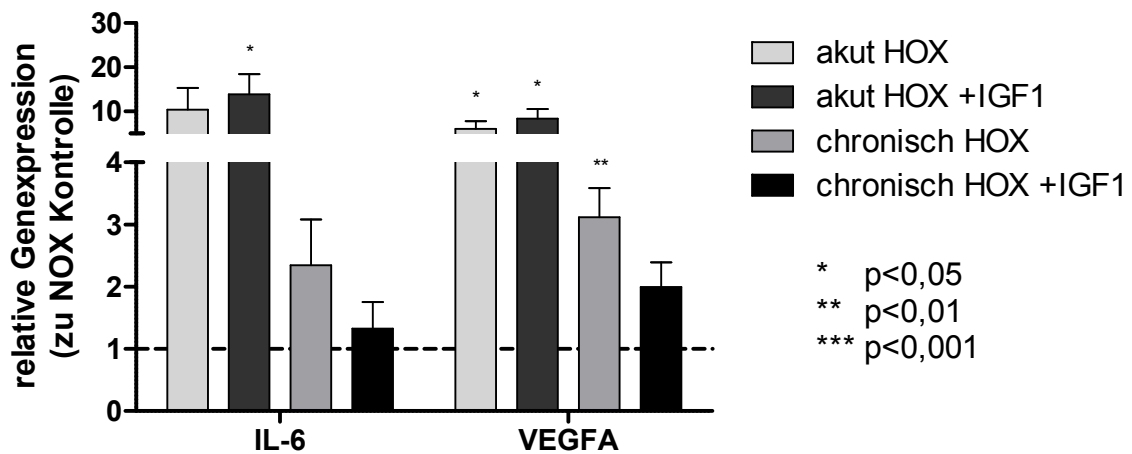


Abb. 34: Einfluss von IGF1 auf IL-6 und VEGFA unter Hypoxie

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit Hypoxie (HOX) und IGF1 auftrat.

Unter Hypoxie waren IL-6 (tendenziell) und VEGFA in der akuten als auch in der chronischen Behandlungsphase hochreguliert. Zu frühen Zeitpunkten wurde kein IGF1-Effekt festgestellt. Bei chronischer Hypoxie zeigte IGF1 tendenziell einen negativen Einfluss.

In **Abbildung 35** wird der Einfluss von IGF1 auf die Expression von IL-1 β und VEGFA unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen in Kombination dargestellt.

Unter Stimulation mit Hypoxie und IL-1 β wurde IL-1 β selbst hochreguliert. Es zeigte sich allerdings kein IGF1-Einfluss auf dessen Expression. Die Expression von VEGFA konnte durch IGF1 positiv beeinflusst werden. Bei chronischer Stimulation waren IL-1 β und VEGFA hochreguliert. Hier hatte IGF1 allerdings einen negativen Einfluss auf die Expression von IL-1 β .

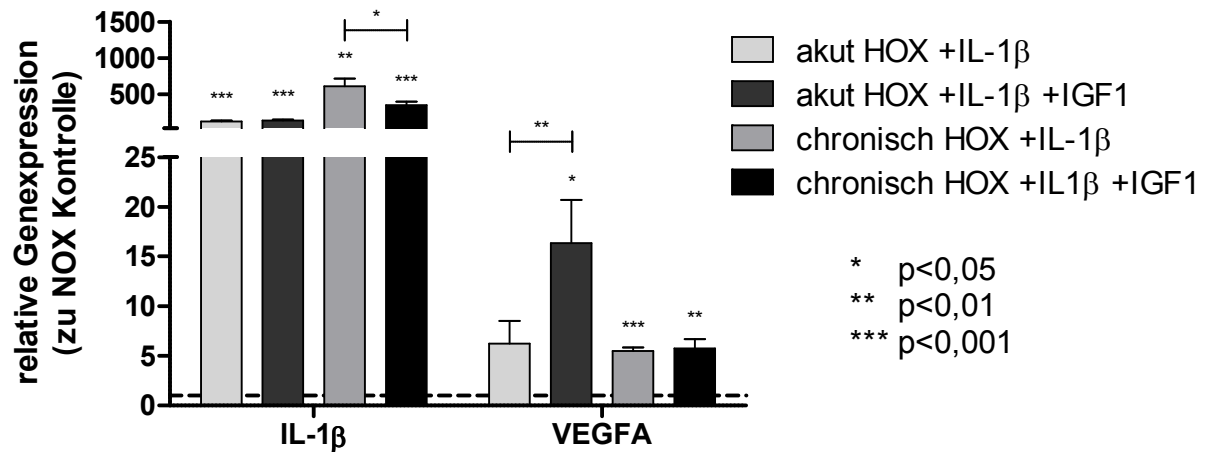


Abb. 35: Einfluss von IGF1 auf IL-1β und VEGFA unter Hypoxie und Entzündung

Dargestellt ist die relative Genexpression im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle. Aus den untersuchten Genen wurden diejenigen ausgewählt, bei denen ein Einfluss von IGF1 entweder während der akuten (2, 4 oder 8 Stunden) oder der chronischen (24, 48 oder 72h) Exposition mit Hypoxie (HOX), IL-1β und IGF1 auftrat.

3.2.5 IGF1 ELISA

Bei den mit IL-1β stimulierten Proben wurde in der PCR eine Expressionssteigerung von IGF1 nachgewiesen. Diese verstärkte Expression könnte zu einem erhöhten IGF1-Proteingehalt im Überstand führen. Um das zu untersuchen, wurde ein IGF1 ELISA Development KIT verwendet. Dazu wurden einige Vorversuche durchgeführt.

3.2.5.1 Qualität der Standardkurve

Es wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Hierbei wurden Konzentrationen von 2000 ng/ml bis 31,25 pg/ml des mitgelieferten IGF1-Standards angesetzt. Dazu wurde die Stock-Lösung schrittweise jeweils 1:1 mit PBS verdünnt, welches 5 % Tween-20 enthielt. Weiterhin wurde eine negative Kontrolle (nur PBS mit 5 % Tween-20) mitgeführt. Außerdem wurde eine weitere Verdünnungsreihe mit dem zu Stimulationen eingesetzten rhIGF1 in den gleichen Konzentrationen hergestellt.

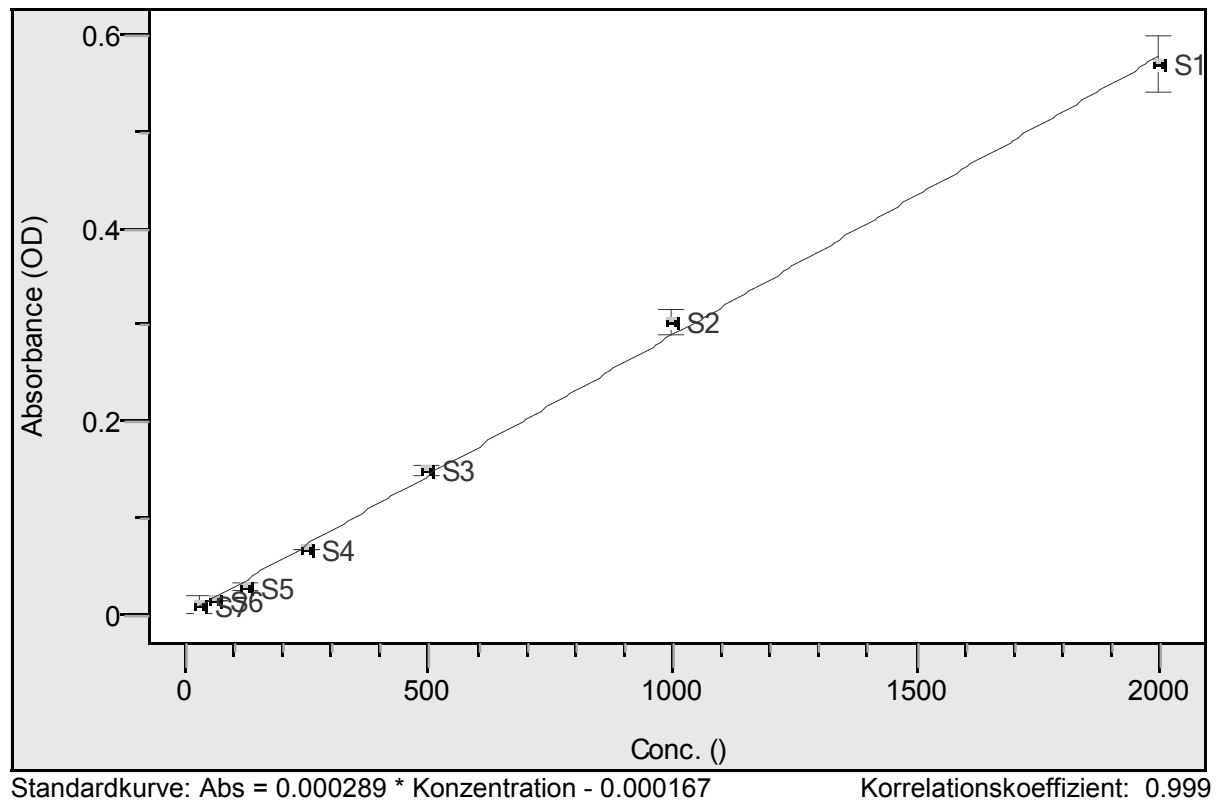


Abb. 36: Darstellung der Standardkurve aus dem ersten Vorversuch

Die folgenden Konzentrationen an IGF1 wurden eingesetzt: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 pg pro ml (X-Achse). Die Absorption (Y-Achse) wurde bei einer Wellenlänge von 415 nm gemessen.

Es zeigte sich eine gute Linearität der Absorption über den gesamten Standard-Bereich (**Abb. 36**). Der eigene Standard mit dem rhIGF1 zeigte insgesamt nur etwa die halbe Konzentration des Kit-internen IGF1-Standards an.

3.2.5.2 Bestimmung der IGF1-Konzentration in Überständen

Beim ersten Versuch zeigten sich deutliche Unregelmäßigkeiten bei den Proben von oben nach unten über die Platte verteilt. Viele Proben waren an der Nachweisgrenze. Es wurden weitere Tests durchgeführt. Zwei unterschiedliche Immunoplaten wurden verwendet, um zu ermitteln, welche Platte besser für die Beschichtung mit dem Fänger-Antikörper geeignet ist. Es wurde eine PolySorp™-Platte (hohe Affinität zu hydrophoben Molekülen) und eine MaxiSorp™-Platte (hohe Affinität zu Molekülen mit gemischten hydrophilen und hydrophoben Domänen) verwendet. Beide Platten wurden komplett mit der gleichen Menge IGF1 aus einem Ansatz beladen. Die

eingesetzte Konzentration wurde so gewählt, dass sie ungefähr in der Größenordnung lag, wie bei den Proben zu erwarten war. Dabei zeigten sich ähnliche Werte. Über die gesamte Platte verteilt zeigte sich ein Unterschied zwischen größtem und kleinstem Wert der Absorption. Hier war bei der MaxiSorp™-Platte ein Unterschied in der Absorption von etwa 20 %, bei der PolySorp™-Platte etwa 24 % festzustellen. Auch bei höheren IGF1-Konzentrationen von 500 pg/ml war prozentual gesehen die gleiche Abweichung über die Platte verteilt zu beobachten.

3.2.5.3 Beeinflussung der IGF1-Zugänglichkeit in den Überständen

In Zellkulturüberständen liegen IGFs möglicherweise in gebundener Form vor. IGF-Bindungsproteine sind in der Regel in hohem Überschuss vorhanden und können IGF1 binden. IGF1 dissoziiert nur sehr langsam und ist in gebundener Form nicht oder nicht ausreichend durch Antikörper erkennbar. Es könnte daher sein, dass mehr IGF1 nachweisbar ist, wenn es gelingt, IGF1 von den Bindungspartnern dauerhaft zu trennen. Es wurde versucht, mit einer hohen Salzkonzentration (500 mM NaCl) die Bindung von IGF1 und IGFBPs zu stören. Außerdem wurden Proben angesäuert (pH 2,5), um die IGFBPs von IGF1 zu trennen. Diese Proben wurden einmal in die Platte gegeben und dort neutralisiert, wo dann die Fänger-Antikörper mit den eventuell teilweise intakten IGFBPs um das IGF1 konkurrieren konnten. Weiterhin wurde versucht, nach der Ansäuerung mit einem großen Überschuss an IGF2 die neuerliche Bindung von IGF1 an die Bindungsproteine zu verhindern. Dazu wurde IGF2 in einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben, die angesäuerte Probe wieder neutralisiert und auf die Platte aufgetragen. Um sicherzustellen, dass ein hoher Überschuss an IGF2 keine Kreuzreaktion verursacht und das Ergebnis verfälscht, wurden 100 ng/ml rhIGF2 alleine eingesetzt. Hierbei zeigte sich eine extrem schwache bis keine Beeinflussung. Das Ergebnis lag nur knapp über den negativen Kontrollen. Außerdem wurde versucht, bei angesäuerten Proben IGF1 über eine MWCO-Säule (10 kDa) von den Bindungsproteinen zu trennen. Die Methode mit der Ansäuerung und dem Überschuss an IGF2 schien am erfolgversprechendsten. Deshalb wurde ein abschließender Versuch durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden Proben für 24 Stunden mit IL-1 β unter Hypoxie und Normoxie stimuliert. Diese Proben wurden sowohl unbehandelt als auch mit der erwähnten Methode für den ELISA eingesetzt. In Tabelle XI wird eine Übersicht über

die Ergebnisse gezeigt. Dabei war nach Säurebehandlung ein erhöhter IGF1-Gehalt nur bei unstimulierten normoxischen und hypoxischen Proben zu erkennen. Bei den IL-1 β -stimulierten Proben lag die Erhöhung noch im vorher ermittelten Fehlerbereich.

	NOX 24 h	HOX (0,5 % O ₂) 24h	IL-1 β 24 h	HOX+IL-1 β 24h
Unbehandelt	17,14 pg/ml	15,96 pg/ml	19,5 pg/ml	17,14 pg/ml
Angesäuert +IGF2	25,40 pg/ml	24,22 pg/ml	21,86 pg/ml	19,5 pg/ml
Veränderung durch Ansäuerung	46 %	52 %	12 %	14 %

Tab. XI: Übersicht über Ergebnisse des IGF1-ELISA

Mit IL-1 β stimulierte Proben (24 h) und unstimulierte Kontrollen (NOX - Normoxie, HOX- Hypoxie) wurden für 5 min angesäuert und mit einem Überschuss an IGF2 versetzt, danach neutralisiert. So behandelte Proben wurden mit der jeweils entsprechenden unbehandelten Probe verglichen.

Die anderen genannten Modifikationen führten zu keinen Veränderungen. In den meisten Fällen lagen die gemessenen Werte im Bereich der Negativkontrolle, teilweise leicht darüber, teilweise sogar darunter.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass PDL-Zellen eine hohe mRNA-Expression der IGF-Bindungsproteine 2 bis 6 besitzen, allerdings wenig IGF1 selbst produzieren. Außerdem verbrauchten diese Zellen nur sehr wenig Sauerstoff, wobei dieser Verbrauch unter Entzündung noch weiter gesenkt wurde. Die Proliferation und Wundheilung wurden durch IGF1, IL-1 β und Hypoxie beeinflusst. Hinsichtlich der Genexpression der untersuchten Gene war ein Einfluss von IL-1 β und Hypoxie festzustellen. IGF1 hatte hier auf mRNA-Ebene eher einen geringen Einfluss.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die PDL-Zellen hinsichtlich der Basisexpression einiger Gene und ihres Sauerstoffbedarfs charakterisiert. Außerdem wurde der Einfluss von IGF1 auf die Proliferation, Differenzierung, Wundheilung und die Expression von Komponenten des IGF-Systems untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob IGF1 für eine Therapie der Parodontitis in Frage kommt. Hat IGF1 einen positiven Effekt auf die bei Parodontitis auftretende Knochenresorption und/oder einen Entzündungsmildernden Effekt? Dabei sind vor allem Differenzierungsvorgänge der verschiedenen Progenitorzellen im PDL interessant.

4.1 Charakterisierung der PDL-Zellen

4.1.1 Konfluente PDL-Zellkulturen können osteogen differenzieren

Die Cadherine CDH2 und CDH11 wurden bei präkonfluenten und konfluenten PDL-Zellkulturen stark exprimiert. Konfluente Kulturen zeigten eine etwa doppelt so starke Expression, was durch die höhere Anzahl an Kontaktpunkten pro Zelle und dem damit verbundenen erhöhten Bedarf an Cadherinen erklärt werden könnte. Andererseits kann eine verstärkte Expression von CDH11 (OB-Cadherin) in der konfluenten Kultur auch für eine osteoblastäre Differenzierung sprechen. Die osteoblastären Marker Osteopontin und Osteocalcin waren allerdings allgemein schwach exprimiert. Die Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 wurden in konfluenten Zellen weniger stark exprimiert. Das könnte damit zu tun haben, dass in konfluenten Kulturen die Zellen weniger proliferieren. Eine weniger starke Expression von Differenzierungsinhibitoren spricht für stärkere Differenzierung. In humanen PDL-Zellen konnte gezeigt werden, dass konfluente Zellkulturen im Vergleich mit präkonfluenten Kulturen verstärkt weitere osteoblastäre Marker (z.B. PTH1R, BMP-2, BMP-4) exprimieren (Lossdörfer et al., 2011).

4.1.2 PDL-Zellen zeigen eine hohe Expression an IGFBPs-2 bis -6

Die IGF-Bindungsproteine waren alle bis auf das IGFBP-1 stark exprimiert, so dass die PDL-Zellen fähig sein sollten, das IGF-System entscheidend zu beeinflussen. Hierbei können lokal sezernierte IGFs als auch systemische, über das Blut ins Gewebe gelangte IGFs in ihrer Wirkung beeinflusst werden.

4.1.3 PDL-Zellen haben einen geringen Sauerstoffbedarf

Präkonfluente PDL-Zellen (50 %) verbrauchen etwa halb so viel Sauerstoff wie konfluente Kulturen. Der Sauerstoffverbrauch steht in einem linearen Verhältnis zur Zellzahl. Am Boden der Kulturplatte werden ohne Zellen etwa 18 % Sauerstoff gemessen, wenn im Inkubationsgas 21 % Sauerstoff vorhanden sind und die Mediumhöhe etwa 2,6 mm beträgt. Mit konfluenten Zellen werden hier Werte um 17 % gemessen. PDL-Zellen haben demnach im Vergleich mit anderen Zelllinien, wie z.B. HaCat und Tumorzellen, einen sehr niedrigen Verbrauch an Sauerstoff (Crokart et al., 2007). Der geringe Sauerstoffbedarf lässt sich eventuell durch die Lage der PDL-Zellen im Organismus erklären. Sie sind in Form eines straffen Bindegewebes in dem schmalen Spalt zwischen Zahnwurzel und Zahnfach im Alveolarknochen lokalisiert. Aufgrund der zahlreich vorhandenen Blutkapillaren kann das PDL zwar nicht zu den bradytrophischen Geweben gezählt werden, allerdings sind diese kleinen Blutgefäße sehr anfällig für mechanische Belastungen des Zahnes. So wird immer wieder die Blutzirkulation unterbrochen, was zu zeitweisen ischämischen Zuständen führt (Kitase et al., 2009). Durch den geringen Sauerstoffverbrauch sind die Zellen gut angepasst und können auch unter schwierigen Bedingungen ihre Zahn- und Knochen-erhaltenden Funktionen ausüben.

4.1.4 Entzündung führt zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch

In den weiteren Untersuchungen wird deutlich, dass eine Entzündungssituation mit einhergehender IL-1 β -Erhöhung zu einem erniedrigten Sauerstoffverbrauch führt. Dieser Effekt wurde z.B. in retinalen Neuronen beobachtet, wobei IL-1 β zu einer Verringerung von intrazellulärem ATP, Verlust des mitochondrialen

Transmembranpotenzials, Caspase-3/7-Aktivierung und LDH-Freisetzung führt. In dieser Arbeit führt IL-1 β zu einem halbierten Sauerstoffverbrauch. Dies ist vergleichbar mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Abcouwer an retinalen Neuronen (Abcouwer et al., 2008). IL-1 β sorgt also für einen negativen Einfluss auf den Energiestoffwechsel, was zu einem verringerten Sauerstoffbedarf beiträgt.

Es sind weitere Versuche notwendig, um die Regulation dieses Effektes aufzuklären. IGF1 hat keine direkte Auswirkung auf den Sauerstoffverbrauch. Unter Einfluss von IGF1 können präkonfluente Zellen schneller proliferieren und so indirekt die Verbrauchsmessung beeinflussen, da eine Zelldichteabhängigkeit besteht (siehe oben). Außerdem ist IGF1 nicht in der Lage, den durch IL-1 β verursachten Effekt umzukehren bzw. zu mildern.

Die weiteren Versuche erfolgten aufgrund des gemessenen Sauerstoffverbrauchs in einem Inkubationsgas mit 0,5 % Sauerstoff.

4.2 Nachweis von HIF-1 α

4.2.1 HIF-1 α transloziert unter 0,5 % Sauerstoff in den Zellkern

Um nachzuweisen, dass unter 0,5 % Sauerstoff in PDL-Zellen echte Hypoxie vorliegt, wurde die Lokalisation und Stabilisierung von HIF-1 α in den PDL-Zellen per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1 α aufgrund seiner Instabilität nur schwach und diffus im Zytoplasma verteilt vorzufinden. HIF-1 α hat unter diesen Bedingungen eine sehr kurze Halbwertszeit (5 Minuten), da es schnell ubiquitiniert, und damit zur proteasomalen Degradation von HIF-1 α markiert wird (Brahimi-Horn et al., 2007). Unter hypoxischen Bedingungen mit 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas ist eine deutliche Anreicherung von HIF-1 α im Zellkern festzustellen. Dies ist auf eine deutlich erhöhte Stabilisierung zurückzuführen. Die inhibierenden Enzyme (PHDs und FIH) sind stark Sauerstoff-abhängig und können ihre Wirkung unter Hypoxie nicht ausüben. HIF-1 α wird nicht hydroxyliert, bleibt damit stabil und wandert in Form eines Dimers (mit HIF-1 β) in den Kern (siehe Einleitung).

4.2.2 IL-1 β fördert die die Anreicherung an HIF-1 α -Protein

Unter Einfluss von Hypoxie und IL-1 β ist ein noch stärkeres Signal zu erkennen. Dies korreliert gut mit dem PCR-Ergebnis, wobei verstärkte Expression, gepaart mit höherer Stabilität, diesen Befund erklären kann. Frede et al. konnten zeigen, dass Stimulation mit IL-1 β nicht zu erhöhter HIF-1 α -Stabilität führt, sondern eher auf dessen verstärkte Translation zurückzuführen ist (Frede et al., 2005). Nach 24 Stunden Hypoxie ist das Signal deutlich schwächer als nach 4 Stunden, egal mit welchem Faktor zusätzlich stimuliert wurde. Auch dieses Ergebnis entspricht den Daten aus der PCR und stellt wahrscheinlich eine Art Rückkopplungsmechanismus dar.

0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas sind ausreichend, um auf PDL-Zellen Hypoxie auszuüben.

4.3 Proliferation

4.3.1 Hypoxie und IGF1 haben einen positiven Einfluss auf die DNA-Synthese

Beim BrdU-Test zeigte sich, dass die PDL-Zellen in den ersten 24 Stunden nach Einführung der Hypoxie ca. 1,4-mal mehr BrdU in neusynthetisierte DNA einbauen als ohne Hypoxie. IGF1 fördert, IL-1 β hingegen vermindert unter beiden Bedingungen die Proliferation der Zellen. Der negative Effekt von IL-1 β wird durch IGF1 aufgehoben, so dass die Proliferation unter gleichzeitiger Gabe von IL-1 β und IGF1 in etwa so stark ist wie unter IGF1-Einfluss alleine. Dieser Befund könnte auf die anti-apoptotische Wirkung von IGF1 zurückzuführen sein (Wood et al., 2009; Annunziata et al., 2010). Eine Erhöhung der Proliferation unter hypoxischen Bedingungen konnte auch bei anderen oralen Zellen beobachtet werden. So wurde bei dentalen Pulpazellen, welche wie PDL-Zellen das Potential zur weiteren Differenzierung besitzen, festgestellt, dass Hypoxie die Proliferation fördert (Amemiya et al., 2003; Iida et al., 2010). Auch in PDL-Zellen von Ratten wurde unter Hypoxie eine verstärkte Proliferation beobachtet (Amemiya et al., 2008).

4.3.2 Hypoxie beeinflusst die Proliferation positiv, IL-1 β negativ

Im WST1-Test konnte das Ergebnis des BrdU-Tests in der Tendenz bestätigt werden. Es erfolgte unter Hypoxie im Allgemeinen eine gesteigerte Umsetzung des Tetrazoliumsalzes zu Formazan, was eine gesteigerte Proliferation indiziert. Bei Stimulation mit rhIGF1 kann man unter normoxischen Bedingungen noch eine verstärkte Proliferation beobachten, während unter hypoxischen Bedingungen dieser Effekt nicht mehr auftritt. Es könnte sein, dass der Hypoxie-Effekt den IGF1-Effekt überwiegt, so dass dieser nicht zum Tragen kommt.

Unter hypoxischen Verhältnissen können Mitochondrien durch sogenannte mitochondriale Autophagie abgebaut werden (Zhang et al., 2008a). Dies ist als überlebenswichtige Anpassung zur Kontrolle der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und DNA-Schäden zu betrachten. Weniger Mitochondrien bedeuten wiederum, dass weniger mitochondriale Dehydrogenaseaktivität (NADH-Dehydrogenase, Succinat-Dehydrogenase) für die Umsetzung von WST-1 zur Verfügung steht. Aufgrund dieses Umstandes dürfte die reale Proliferationsrate unter Hypoxie unterschätzt sein. Unter Einfluss von IL-1 β ist unter beiden Bedingungen eine Reduktion der Proliferation zu erkennen, was sicher auch auf die pro-apoptotischen Effekte von IL-1 β sowie den störenden Einfluss auf die Elektronentransportkette zurückzuführen ist (Abcouwer et al., 2008). IGF1 führt nicht zu einer Umkehrung des Effekts von IL-1 β . Der WST-1-Test erscheint unter diesen Umständen, wie der Beeinflussung der Mitochondrien durch hypoxische Verhältnisse, weniger aussagekräftig als der BrdU-Test. Außerdem sind weitere Untersuchungen hinsichtlich des Apoptoseverhaltens von PDL-Zellen unter Hypoxie notwendig, um pro- oder anti-apoptotische Effekte der einzelnen Stimulanzen herauszurechnen und somit die reale Proliferationsrate zu bestimmen.

4.4 Wundheilungsexperimente

4.4.1 IGF1 hat einen positiven Einfluss auf die Wundheilung unter normoxischen, hypoxischen sowie entzündlichen Bedingungen

Bei durch vorsichtiges Zerkratzen eines PDL-Zellrasens hervorgerufener „Verwundung“ wird deutlich, dass unter IGF1-Einfluss die „Wunde“ am effektivsten zuwächst. Dies ist unter normoxischen Zuständen genauso der Fall wie unter hypoxischen Bedingungen. Unter Einfluss von IL-1 β wird eine deutliche Verzögerung der Wundheilung erreicht. Auch hier gibt es keinen Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie. Unter Hypoxie kann man im Vergleich zur unstimulierten, normoxischen Kontrolle eine gesteigerte Wundfüllung zwischen 48 und 72 Stunden erkennen. Das gleiche Phänomen tritt tendenziell bei kombinierter Stimulation mit IL-1 β und IGF1 unter Hypoxie auf. IGF1 hat einen positiven Einfluss auf die Wundheilung und kann die negativen Effekte von IL-1 β komplett ausgleichen. Der positive Einfluss von IGF1 sowie der negative Einfluss von IL-1 β wurden auch in anderen Arbeiten an PDL-Zellen nachgewiesen (Nokhbehsaim et al., 2011). Die Unterschiede zwischen Proliferationstests (gesteigerte Proliferation unter Hypoxie) und Wundheilungsversuchen (kaum Einfluss) lassen sich eventuell auf den experimentellen Ansatz zurückführen. Bei der Proliferation wurden präkonfluente Kulturen stimuliert, um Wachstum zu ermöglichen, während bei den Wundheilungsexperimenten konfluente Kulturen verwendet wurden. Dabei betrachtet man bei den Proliferationstests mit den präkonfluenten Zellen einen wesentlich größeren Anteil der Zellen. Bei der Wundheilung werden im Prinzip nur die Zellen im Randbereich der „Wunden“ beachtet, so dass Unterschiede weniger deutlich werden. Die Proliferation sollte bei den konfluenten Zellen aufgrund von Kontaktinhibition wesentlich höher sein als bei den präkonfluenten PDL-Zellen. Bei der verstärkten Wundfüllung unter IGF1-Einfluss könnte weiterhin auch Migration eine Rolle spielen, da IGF1 diese fördern kann (Tai et al., 2003; Marelli et al., 2006). Die negativen Effekte von IL-1 β können auch hier wieder durch die pro-apoptotische Wirkung von IL-1 β erklärt werden. IGF1 kann diese Effekte vermutlich aufgrund seiner anti-apoptotischen Wirkung und durch erhöhte Proliferation bzw. Migration ausgleichen.

4.5 Differenzielle Genexpression in PDL-Zellen

4.5.1 IGF1, IL-1 β und Hypoxie haben einen Einfluss auf die Expression von Differenzierungsmarkern und Differenzierungsinhibitoren

Um die Auswirkungen von IL-1 β , Hypoxie und IGF1 auf die Differenzierung von PDL-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression einiger Gene untersucht. Einerseits wurden klassische osteoblastäre Differenzierungsmarker, wie Osteocalcin und Osteopontin untersucht (Lian et al., 1989). Aber auch andere Moleküle, welche die osteogene Differenzierung inhibieren können, wie ID1 und ID2 wurden betrachtet (Zhang et al., 2008b). Außerdem wurden Adhäsionsmoleküle untersucht, da z.B. das Osteoblasten (OB)-Cadherin (CDH11) zur Ossifikation beitragen kann, und eventuell ein Switch von N-Cadherin zu OB-Cadherin stattfinden könnte (Di Benedetto et al., 2010).

Interleukin-1 β zeigte einen positiven Einfluss auf die Regulation von N-Cadherin, während Hypoxie und IGF1 alleine keine Regulation bewirkten. N-Cadherin hat einen Einfluss auf Knochenbildung, Osteoblasten-Differenzierung bzw. Osteogenese. N-Cadherin übt einen negativen Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung aus, indem es mit dem LRP5/ β -Catenin-Signalweg interferiert (Haÿ et al., 2009a, 2009b). Weiterhin konnte durch diverse Studien gezeigt werden, dass N-Cadherin mit verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen interagieren kann. Hier ist besonders der FGF-Rezeptor hervorzuheben (Wheelock and Johnson, 2003). Dieser vermittelt durch die Interaktion mit N-Cadherin auch in Abwesenheit des Wachstumsfaktors FGF einige zelluläre Prozesse, wie z. B. das Auswachsen von Neuriten, Proliferation, Migration, Differenzierung, aber auch Angiogenese (Doherty et al., 2000; Derycke et al., 2006). N-Cadherin kann von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) gespalten werden, und so auch in Form von löslichen Fragmenten mit anderen Zellen interagieren (Dwivedi et al., 2009; Williams et al., 2010). N-Cadherin könnte auf diese Weise unter entzündlichen Bedingungen einen Beitrag zur Angiogenese leisten, da viele MMPs bei Entzündung freigesetzt werden. Außerdem könnte es durch Hemmung der Osteoblastendifferenzierung den Knochenmetabolismus negativ beeinflussen, so dass mehr Knochenabbau als –aufbau stattfindet.

Das OB-Cadherin (CDH11) wurde unter Hypoxie als auch unter IL-1 β hochreguliert. OB-Cadherin spielt bei der Metastasierung von Tumorzellen in Knochen eine große Rolle. Eine hohe Expression von OB-Cadherin ist z.B. zur Interaktion von Brustkrebszellen und Prostatakrebszellen mit Knochen verantwortlich (Tamura et al., 2008; Huang et al., 2010). Dies führt zu einer Hochregulation von Parathyroidhormon-related Peptid, welches wiederum zur Osteoklastogenese beiträgt (Tamura et al., 2008). Da OB-Cadherin durch hypoxische, inflammatorische Bedingungen in PDL-Zellen hochreguliert wurde, wäre eine Wechselwirkung mit angrenzendem Knochengewebe des Alveolarknochens im Verlauf der Parodontitis denkbar. Dieser könnte dann auf eine ähnliche Weise wie bei der Metastasierung durch Tumorzellen über die Aktivierung von Osteoklasten abgebaut werden. Erhöhte Levels an OB-Cadherin führen in Fibroblasten allerdings auch zu verstärkten Zell-Zell-Kontakten und damit verbunden zu einer Induktion der VEGFD-Expression (Orlandini and Oliviero, 2001). Dieses wirkt wiederum auf Endothelzellen und fördert z.B. Prozesse wie Angiogenese, und Lymphangiogenese (Tanaka et al., 2010). Auch hier ist eine Beteiligung des OB-Cadherins an angiogenen und Knochen-destruktiven Prozessen im PDL denkbar.

ID-Proteine sind Inhibitoren von Helix-loop-Helix (HLH)-Transkriptionsfaktoren. Im Promotor des Osteocalcin-Gens und anderen Osteoblasten-spezifischen Markern wurde z.B. ein E-Box-Motiv indentifiziert, an welches HLH-Transkriptionsfaktoren binden und die Expression des Gens positiv beeinflussen kann. ID1 kann diese Reaktion unterbinden und so die Osteoblasten-spezifische Genexpression unterdrücken (Tamura and Noda, 1994). Die ID2-Expression wird über die Aktivierung des IGF1R reguliert. Hierbei kann einerseits eine positive Regulation über den MAPK- und den PI3K-Weg stattfinden. Eine Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrates1 (IRS1) durch Tyrosin 950 des IGF1R führt über den PI3K-Weg zu einer Erhöhung der ID2-Expression in 32D murinen hämatopoetischen Zellen (Navarro et al., 2001). Andererseits kann über Tyrosin 950 des IGF1R aber auch eine Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3 eingeleitet werden, was zu einer negativen Regulation der ID2-Expression führt (Prisco et al., 2001). Dadurch würden Zellen eher zu Differenzierung neigen. Aufgrund der relativ hohen Expression von IGF1R und IRS1 könnte man annehmen, dass ID2 eher hochreguliert sein sollte. Da das nicht der Fall ist, scheint es eine Konkurrenz von

STAT3 und IRS1 zu geben, wobei ein gut ausbalanciertes Verhältnis bestehen sollte und die Signalübertragung über STAT3 eine negative Rückkopplung darstellt. Daher könnte die Verringerung der Expression lediglich durch die verminderte Expression des IGF1R oder durch extrazelluläre Modulation der Signalübertragung über den IGF1R, z.B. durch Bindungsproteine oder andere Faktoren hervorgerufen worden sein. Auch könnte gleichzeitig eine erhöhte Stabilität von ID2 auf Proteinebene zu einer Anhäufung von ID2-Protein führen. Dies könnte über negative Rückkopplungsmechanismen auf die Genexpression Einfluss haben. Da die PDL-Zellen unter IGF1-Einfluss stärker proliferieren und die ID-Proteine einen entscheidenden positiven Einfluss auf den Zellzyklus haben, die Genexpression damit aber nicht übereinstimmt, ist anzunehmen, dass ID2 als wichtiger Förderer der Proliferation auf Proteinebene positiv beeinflusst ist. Die ID1-Expression kann ebenfalls über den IGF1R reguliert werden. Auch hier sind zellspezifisch verschiedene Signalwege beteiligt (Belletti et al., 2002). Der PI3K/AKT-Signalweg hat auch hier einen positiven Einfluss auf die Expression (Su et al., 2010). ID-Proteinen werden Funktionen in der Regulation von Tumorwachstum, Vaskularisierung, Invasivität und Metastasierung zugeschrieben (Norton, 2000). In Neuroblastomen wurde nachgewiesen, dass die Expression von ID2 durch Hypoxie hochreguliert wird (Löfstedt et al., 2004). Dies führt zu einem Verlust spezifischer Marker und zu einer De-Differenzierung. In vielen Zellen wird jedoch unter Hypoxie ATF-3 hochreguliert, was zu einer Repression der ID1- und ID-2 Expression führt. In anderen Zellen, wie z.B. in vielen Neuroblastoma-Zelllinien, erfolgt die Induktion von ATF-3 nicht, so dass die Expression der Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 hochreguliert wird (Nemetski and Gardner, 2007). Langfristig gesehen wird durch die einzelnen Stimulationen mit IGF1, IL-1 β und Hypoxie kein Einfluss auf die ID1- und ID2-Expression ausgeübt.

Osteocalcin als Marker des Knochenaufbaus wurde unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert, während die Expression von Osteopontin herunterreguliert und Periostin weitgehend unbeeinflusst war. Unter IGF1-Einfluss wurde Osteocalcin nach 8 und 24 Stunden Inkubation herunterreguliert. IL-1 β zeigte einen negativen Einfluss auf die Osteopontin-Expression unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen. Verschiedene Studien zeigen, dass IL-1 β und Hypoxie einen negativen Einfluss auf die Osteocalcin-Expression haben. Bei mesenchymalen

Stammzellen und aus ihnen abgeleiteten Osteoblasten wurde z. B. gezeigt, dass IL-1 β die Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX2 negativ reguliert und dadurch die Expression von Osteocalcin hemmt (Ding et al., 2009). Auch Hypoxie kann die Expression von RUNX2 herunterregulieren, und so die Expression von Osteocalcin negativ beeinflussen (Park et al., 2002). Diese Erkenntnisse stehen im Kontrast zu den PCR-Daten dieser Arbeit. Allerdings sind an der Regulation von Osteocalcin weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt, so dass hier eine Zell-Typ-spezifische Reaktion zu beobachten sein könnte (Lian et al., 1989). Auch epigenetische Veränderungen sind denkbar. So reagieren osteogen differenzierende Zellen unterschiedlich hinsichtlich Methylierungen in Osteocalcin und Osteopontin-Promotoren, wenn sie biomechanisch stimuliert werden (Arnsdorf et al., 2010). Ähnliche Unterschiede könnten auch bei Stimulationen mit IL-1 β oder Hypoxie auftreten.

Periostin wurde unter Hypoxie nicht reguliert. IL-1 β regulierte bei längerer Stimulation Periostin negativ. Dies entspricht einer chronischen Entzündung, wie z.B. bei der Parodontitis. Im Mausmodell mit Periostin-Null-Mäusen wurde gezeigt, dass Periostin sehr wichtig für die Integrität des PDLs und bei mechanischer Belastung, z.B. durch Kauen, ist (Rios et al., 2008). Bei den Periostin-Null-Mäusen ist eine fortschreitende Zerstörung des Zahnhalteapparats festzustellen, welche gekennzeichnet ist durch massiven Alveolarknochenverlust, Kontaktverlust, durch Wurzelresorption und Verbreiterung des PDLs (Rios et al., 2008). Interessanterweise war IGF1 in der Lage, Periostin nach längerer Stimulation positiv zu regulieren. Bei kombinierter Gabe von IL-1 β und IGF1 konnte IGF1 den Effekt von IL-1 β allerdings nicht umkehren. Der IGF1-Effekt könnte damit in Zusammenhang stehen, dass die Zellen unter IGF1-Einfluss stärker proliferieren und somit schneller konfluent sind. Das könnte dann im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen zu einer vermehrten Produktion von Periostin führen.

4.5.1.1 Hypoxie und IL-1 β können einen negativen Einfluss auf den Knochenmetabolismus, aber auch einen positiven Einfluss auf die Angiogenese ausüben

Hypoxie könnte in PDL eine vermehrte Rekrutierung von Osteoklasten, eine Induktion von angiogenen Mechanismen, inklusive Lymphangiogenese, sowie eine verstärkte Migration, z.B. von endothelialen Zellen auslösen. Es ist ein negativer Einfluss auf den Knochen anzunehmen, obwohl die Expression von Osteocalcin leicht gesteigert ist. IL-1 β könnte sich ebenfalls positiv auf die Rekrutierung von Osteoklasten, aber auch auf die Angiogenese und Lymphangiogenese auswirken. Auch hier wäre wieder ein negativer Einfluss auf den Knochen zu verzeichnen. Die mit IL-1 β verbundene starke Expressionssteigerung von IL-6 unterstützt diese Vermutung. IL-6 wirkt positiv auf die Osteoklastenbildung und auf die Angiogenese (Roodman et al., 1992; Ancrile et al., 2007). Außerdem sollte IL-1 β bei längerer Einwirkung (72 h) einen negativen Einfluss auf die Integrität des PDLs haben und Wurzelresorption verursachen. Ein negativer Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung und somit Knochen-bildende Prozesse ist anzunehmen.

Unter Einfluss von IL-1 β verminderte IGF1 die zu späteren Stimulationszeitpunkten erhöhte Expression von N- und OB-Cadherin. Dies könnte deren potenziell positiven angiogenen Einfluss mindern, aber gleichzeitig auch die eventuell verstärkte Osteoklastogenese hemmen. Auch die Expression von Osteocalcin und ID2 ist leicht negativ beeinflusst. Die anderen Gene waren nicht durch IGF1 beeinflusst.

Unter Hypoxie hatte IGF1 einen negativen Einfluss auf die Expression der Differenzierungsinhibitoren ID1 und ID2 zu frühen Stimulationszeitpunkten, wobei ID1 durch die Hypoxie unbeeinflusst war und hier IGF1 allein den Effekt verursachte. Anfänglich hochreguliertes ID2 wird durch IGF1 herunterreguliert. Zu späten Stimulationszeitpunkten bleibt ein IGF1-Effekt aus.

Unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen zeigte IGF1 keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene.

IGF1 hat insgesamt keinen entscheidenden Einfluss auf die Expression der Differenzierungsmarker.

4.5.2 IGF1, IL-1 β und Hypoxie haben einen Einfluss auf die Expression von Komponenten des IGF-Systems

Die Expression des IGF1R wurde unter Hypoxie schnell und kurzzeitig hochreguliert. Unter IGF1-Einfluss war die Expression etwa auf die Hälfte der bei unbehandelten Zellen beobachteten Expression herunterreguliert. Dies ist wahrscheinlich auf eine negative Feedback-Reaktion über die Aktivierung von AKT zurückzuführen (Qin et al., 2011). Es könnte auch sein, dass der IGF1R auf Protein-Ebene stabilisiert wird und die Expression herunterreguliert wird, um eine positive Rückkopplung und somit überschießende Effekte zu vermeiden. IGF1 hatte hier eine dominierende Wirkung gegenüber der Stimulation mit IL-1 β sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Verhältnissen.

Unter Stimulation mit IGF1 wurde das IGF-Bindungsprotein 1 um den Faktor 2 herunterreguliert. Unter Einfluss von IL-1 β war die Expression von IGFBP-1 positiv beeinflusst. Die Expression von IGFBP-1 sank nach 4-stündiger Hypoxie um den Faktor 4, stieg danach jedoch wieder deutlich an und erreichte nach 72 Stunden eine 4-fache Steigerung. Bei Stimulation mit IL-1 β war die Expression von IGFBP-1 nach 2 Stunden um den Faktor 2 herunterreguliert. Nach 24 Stunden stieg sie allerdings wieder auf das 4-Fache der unstimulierten hypoxischen Kontrolle an. Bei kombinierter Gabe von IL-1 β und IGF1 unter Hypoxie war IGFBP-1 nach 2-stündiger Inkubation 3-fach herunterreguliert.

IGFBP-1 und IGFBP-2 werden eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des Blutglukose-Levels und der Insulin-Sensitivität zugesprochen (Wheatcroft and Kearney, 2009). Sie können IGF-abhängige, aber auch IGF-unabhängige Effekte vermitteln. Eine Überexpression von IGFBP-1 kann z.B. IGF1-unabhängig über die Bindung an α V β 1-Integrin zu einer Aktivierung der Fokaladhäsions-Kinase (FAK) und Stimulation des MAPK-Pfades und somit zu einer verstärkten Migration führen (Jones et al., 1993a; Gleeson et al., 2001). Im Gegensatz zu diesen stimulatorischen Wirkungen wurde durch IGFBP-1-Behandlung in Brustkrebszellen durch IGFBP-1-Bindung an Integrin und Dephosphorylierung von FAK verstärkte Apoptose beobachtet (Perks et al., 1999). Der Promotor des IGFBP-1-Gens besitzt ein Insulin-Response-Element, welches für eine negative Regulation der IGFBP-1-Expression sorgt (Suwanichkul et al., 1994). Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies können die

Expression von IGFBP-1 positiv beeinflussen (Lang et al., 1999). So stimuliert z.B. IL-6 die IGFBP-1-Produktion (Samstein et al., 1996). Die erhöhte Expression von IGFBP-1 unter IL-1 β -Stimulation könnte deshalb auf die unter IL-1 β -Einfluss beobachtete Erhöhung der IL-6-Expression zurückzuführen sein. IL-1 β stimuliert außerdem die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in diversen Zelllinien, was die Expression von IGFBP-1 positiv beeinflussen kann (Mendes et al., 2003; Brigelius-Flohé et al., 2004; Hwang et al., 2004; Kaur et al., 2004). Unter Hypoxie wird die Expression von IGFBP-1 früh herunterreguliert, geht später (24h, 48h) aber wieder über das Niveau der Kontrollen hinaus. Diverse Studien deuten darauf hin, dass eine erhöhte Expression von IGFBP-1 unter Hypoxie und anderen katabolen Bedingungen dazu dient, die Verfügbarkeit von IGF1 für die Rezeptoren zu verringern (Kajimura et al., 2005; Fowden et al., 2006; Kajimura and Duan, 2007). Das könnte dazu dienen, die limitierten Energiereserven nicht in Wachstum, sondern in lebenserhaltende metabolische Prozesse zu investieren. In HepG2-Zellen wurde ein Hypoxie-Response-Element in Intron 2 des humanen IGFBP-1 nachgewiesen (Tazuke et al., 1998). Die Bindungsaffinität von IGFBP-1 für IGF1 wird durch Phosphorylierung verstärkt (Jones et al., 1993a). Phosphorylierung führt außerdem zu einer erhöhten proteolytischen Stabilität des Proteins (Gibson et al., 2001). Aufgrund der im Vergleich mit den anderen Bindungsproteinen relativ schwachen Expression in PDL-Zellen und der eher systemischen Wirkung, scheint IGFBP-1 in diesem System eine untergeordnete Rolle zu spielen. IGFBP-1 besitzt diverse Promotor-Elemente. Hier gibt es ein oder mehrere Insulin-Response-Elemente, durch welche die Expression von IGFBP-1 nach Insulin-Einfluss inhibiert werden kann (Patel et al., 2002). Eine Signalübertragung über den IGF1-induzierten PI3-Kinase/Akt/mTOR-Weg ist eine Möglichkeit, die verringerte Genexpression von IGFBP-1 unter IGF1-Einfluss zu erklären.

Unter Einfluss von IL-1 β war die Expression von IGFBP-2 zunächst positiv beeinflusst. Bei Langzeitstimulation deutet sich jedoch ein Rückgang der IGFBP-2-Expression an. Bei Kultivierung mit 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas wurde die Expression des Bindungsproteins 2 nach kurzer Stimulation gesteigert. Dieser Effekt war sehr schnell wieder abgeklungen. Bei Stimulation mit IL-1 β wurde IGFBP-2 unter hypoxischen Verhältnissen im Vergleich mit der hypoxischen Kontrolle um den Faktor 2 herunterreguliert. Es ist bekannt, dass über IGF2/IGFBP-2-Signaling die osteogene

Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen initiiert werden kann. Dabei spielt Integrin αV eine große Rolle, indem es die Expression von IGFBP-2 erhöht (Hamidouche et al., 2010). Bekanntlich dominiert bei der Parodontitis die Knochenresorption. Dazu passen die Ergebnisse. Bei Langzeitstimulation mit IL-1 β oder bei gleichzeitigen hypoxischen Bedingungen war IGFBP-2 herunterreguliert, so dass man davon ausgehen kann, dass zumindest keine osteogene Differenzierung auftreten sollte. Auch die kurzzeitige Expressionssteigerung mit anschließender Normalisierung unter Hypoxie mit eventuell assoziierter Expressionsteigerung von Integrin αV schließt eine osteogene Differenzierung der PDL-Zellen aus (Ryu et al., 2010). IGFBP-2 hat einen vergleichbaren Einfluss auf die metabolische Homöostase und die Insulin-Sensitivität wie IGFBP-1. Ihm wird ein anti-apoptotischer Effekt unabhängig von IGF1 zugesprochen (Migita et al., 2010). IGFBP-2 ist bisher erst unzureichend untersucht worden. Seine Regulation und die physiologische Rolle sind nicht vollständig geklärt. IGFBP-2 wird im Erwachsenen vorwiegend in der Leber, in Adipozyten, im Reproduktionsapparat und im zentralen Nervensystem exprimiert (Shimasaki and Ling, 1991). Es gibt keine bekannten Phosphorylierungs-Isoformen und über andere posttranslationale Modifikationen von IGFBP-2 ist wenig bekannt. Ähnlich wie IGFBP-1 besitzt es ein RGD-Motiv zur Erkennung von Integrinen und eine Domäne zur Heparin-Bindung (Wheatcroft and Kearney, 2009). Auch ein Insulin-reguliertes Element ist im IGFBP-2-Promotor vorhanden, aber die Insulin-induzierte Inhibierung der IGFBP-2-Expression findet deutlich langsamer statt als bei IGFBP-1 (Brown and Rechler, 1990; Böni-Schnetzler et al., 1990; Schmid et al., 1992; De et al., 1996; Ernst and White, 1996). Wie beim IGFBP-1 sind sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Effekte auf die IGF1-Wirkung bekannt (Jones and Clemmons, 1995; Clemmons, 1998). IGFBP-2 kann IGF1-unabhängig z.B. in Brustkrebszellen über Interaktionen mit $\alpha V\beta 1$ -Integrin zu einer FAK-Phosphorylierung führen, was eine Interaktion mit dem Insulin- und IGF1-Signalweg darstellt (siehe IGFBP-1) (Schütt et al., 2004). In Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass IGFBP-2-Bindung an $\alpha V\beta 1$ -Integrin auch die Wirkung von PTEN inhibiert (Perks et al., 2007). PTEN ist als negativer Regulator des Insulinsignalwegs in Adipozyten und Skelettmuskulatur bekannt, wobei es zu einer Dephosphorylierung von PIP3 kommt und somit inaktives PIP2 entsteht (Tang et al., 2005; Hu et al., 2007). IGF1 führt über den IGF1R ebenso zu einer Verringerung der PTEN-Aktivität (Ma et al., 2010).

Hypoxie kann die Expression von IGFBP-3 über p53-unabhängige und p53-abhängige Mechanismen induzieren (Grimberg et al., 2005). IGFBP-3 ist durch zahlreiche weitere Faktoren auf mRNA- und Protein-Ebene beeinflussbar. Hier wären Vitamin D, p53, Androgen, Anti-Östrogen, TGF- β , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Retinsäure, Natriumbutyrat, Wachstumshormon, EGF und IGF1 zu nennen (Yamada and Lee, 2009). Dabei gibt es meist Zeit- und Dosis-abhängige Effekte. In Wachstumshormon-defizienten Zwergratten induzierte eine IGF1-Infusion die mRNA-Expression von IGFBP-3 in der Haut, nicht aber in Muskel und Leber (Lemmey et al., 1997). Das lässt auf eine Gewebe-spezifische Regulation schließen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten PDL-Zellen war IGFBP-3 durch IGF1 auf mRNA-Ebene nicht reguliert. IL-1 β verursacht in Leydig-Zellen von Ratten eine Zeit- und Dosis-abhängige Induktion der IGFBP-3-Expression (Wang et al., 1995a). Auffällig war die positive Regulation der IGFBP-3-Expression in PDL-Zellen unter hypoxischen Verhältnissen nach Stimulation mit IL-1 β . Die Expression von IGFBP-3 ist unter Hypoxie allein positiv beeinflusst, während IL-1 β allein aber keinen Einfluss ausübt. Die Kombination von IL-1 β und Hypoxie führt jedoch zu einer gesteigerten Expression von IGFBP-3 über das durch Hypoxie induzierte Niveau hinaus. Es muss davon ausgegangen werden, dass diese zwei Faktoren einen positiven Regulator der IGFBP-3-Expression positiv beeinflussen. Hier könnte die durch IL-1 β verursachte Erhöhung der HIF-1 α -Expression, gepaart mit der hohen Stabilität von HIF-1 α unter Sauerstoffmangel eine naheliegende Erklärung sein. Obwohl kein erkennbares HIF-bindendes Element im Promotor von IGFBP-3 nachgewiesen wurde, reguliert Hypoxie die Expression positiv (Feldser et al., 1999). IGFBP-3 kann viele unterschiedliche Funktionen ausüben. Es kann sowohl IGF-abhängig als auch IGF-unabhängig Wachstum inhibieren und Apoptose fördern. Es kann IGF-abhängig außerdem Wachstum fördern und je nachdem, mit welchen Partnern es interagiert, unterschiedliche Effekte hervorrufen. In Verbindung mit Fibronektin kann es z.B. IGF-unabhängig die Proliferation und Überleben der Zellen fördern, während ohne Fibronektin Apoptose ausgelöst wird (Yamada and Lee, 2009). IGFBP-3 kann aktiv über Caveolin-1- und/oder Transferinrezeptor-vermittelte Endozytose in Zellen aufgenommen werden. Außerdem besitzt IGFBP-3 eine NLS-Sequenz, welche einen Importin- β -vermittelten Transport von IGFBP-3 in den Zellkern erlaubt. Hier kann es zusammen mit löslichen Rezeptoren und anderen Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene beeinflussen (Yamada and Lee, 2009). Insgesamt

gesehen, sind Transkription, Verfügbarkeit und Wirkung von IGFBP-3 vielfältig reguliert. Hierbei spielen z.B. Wachstumsfaktoren, Proteine der extrazellulären Matrix, Steroidhormone und Oberflächenrezeptoren eine entscheidende Rolle.

Die Expression von IGFBP-4 war unter Hypoxie- oder IGF1-Einfluss unverändert. IL-1 β -Stimulation zeigte einen positiven Einfluss. Unter Hypoxie war der Effekt von IGF1 nach 24 Stunden negativ, aber nach 48 Stunden ist dieser Effekt nicht mehr zu sehen. Auch unter Hypoxie hatte IL-1 β einen positiven Einfluss auf die Expression von IGFBP-4. Die Kombination von Hypoxie, IGF1 und IL-1 β führte dazu, dass die Expression auf dem Level der unstimulierten, normoxischen Kontrollen blieb. Die Effekte der Einzelstimulationen hoben sich gegenseitig auf. IGFBP-4 hat inhibierende Effekte auf die IGF-Wirkung. Diese inhibierende Wirkung von IGFBP-4 wird durch eine IGF-aktivierte IGFBP-4-Protease aufgehoben. Diese Protease wurde als PAPP-A identifiziert, welche IGFBP-4 spaltet. Die entstehenden Fragmente haben nur eine geringe Affinität zu IGF1 (Firth and Baxter, 2002). Die Erhöhung der IGFBP-4-Expression durch IL-1 β könnte möglicherweise über eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors SP-3 erklärt werden. Über den durch IL-1 β induzierten NF- κ B-Weg wird SP3 induziert (Baugé et al., 2008). Dieser Transkriptionsfaktor könnte an der in der Promotorregion von IGFBP-4 nachgewiesenen SP3-Bindestelle binden und die Transkription von IGFBP-4 fördern (Shen and Singh, 2004). Hypoxie kann ebenfalls SP-3 regulieren. Hier spielt aber die Schwere der Hypoxie eine Rolle. Außerdem werden noch viele weitere Transkriptionsfaktoren unter Hypoxie reguliert (Cummins and Taylor, 2005), die je nach Schwere der Hypoxie oder Zelltyp-spezifisch unterschiedlich reguliert oder in verschiedenen Transkriptionsfaktorkomplexen involviert sein könnten.

Die Expression von IGFBP-5 war unter Hypoxie nach kurzer Zeit hochreguliert. Hierbei könnten z.B. die durch Hypoxie beeinflussten Transkriptionsfaktoren CREB und C/EBP eine Rolle spielen (Cummins and Taylor, 2005). Es wurde gezeigt, dass im IGFBP-5-Promotor ein CCAAT-Element sowie cAMP-responsive Elemente vorhanden sind, an welche die genannten Faktoren gebunden werden und die Expression von IGFBP-5 steigern könnten (Beattie et al., 2006b). Das von Hippel-Lindau (VHL)-Protein sorgt unter Normoxie im Komplex mit anderen Proteinen (Elongin B und C, Cul2, Rbx1) für die Ubiquitinierung und Degradierung von HIF-1 α

(siehe Einleitung). Unter Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert, VHL bindet nicht mehr. Für VHL wurde kürzlich ein weiteres Substrat nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um das Myb-Bindungsprotein p160, welches dann degradiert wird (Lai et al., 2011). Dieser Vorgang könnte durch Hypoxie und dem damit verstärkt frei gewordenen VHL begünstigt werden. Weniger p160 würde auch bedeuten, dass weniger Myb-Faktoren gebunden werden und selbst an die Myb-Bindestelle im IGFBP-5-Promotor (Beattie et al., 2006b) binden können. Eine Behandlung der PDL-Zellen mit IGF1 führt nach 4 Stunden zu einer Erhöhung der IGFBP-5-Expression, welche dann aber nach 8 und 24 Stunden unter das Kontrollniveau fällt. Es wurde nachgewiesen, dass IGF1 die Expression von IGFBP-5 reguliert. Hier sind je nach Zelllinie die verschiedenen durch IGF1 beeinflussten Signalwege über die PI3K sowie MAPK beteiligt. Zelltypspezifisch können beide Wege die Expression unterschiedlich beeinflussen (Cheng et al., 1999; Duan et al., 1999; Kuemmerle, 2000; Kiepe et al., 2005). Hier könnte die Expression von IGFBP-5 durch beide Signalwege beeinflusst sein, so dass sich beide Effekte gegenseitig aufheben. Unter Einfluss von IL-1 β wurde die Expression von IGFBP-5 wenig beeinflusst. Hier sah man nach 2 und 24 Stunden einen leicht positiven Einfluss unter Normoxie, wobei unter Hypoxie dieser Effekt nach 2 Stunden ausblieb. Auch IGFBP-5 kann auf Proteinebene vielfältig reguliert werden. Hier gibt es verschiedene Proteasen, wie z.B. Plasmin, Thrombin, Cathepsin G, Elastase, ADAM-12s, ADAM-9, C1s, PAPP-A und PAPP-A2, die es spalten und so gebundenes IGF freisetzen können (Beattie et al., 2006b). IGFBP-5 kann aber auch mit Proteinen der extrazellulären Matrix interagieren. Es kann über Rezeptoren, die noch nicht genau charakterisiert sind, IGF-unabhängige Wirkungen entfalten. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass IGFBP-5 über eine Rezeptor-Serin-Kinase ein G-Protein G α i3 aktiviert. Dadurch wird in glatten Muskelzellen des Darms über den p38/MAPK- und den ERK1/2-Weg die Produktion von Kollagen und IGF1 sowie die Muskelzellproliferation angeregt (Flynn et al., 2009). Außerdem könnte IGFBP-5 IGF-unabhängig Einfluss auf die Bindung von Adhäsionsmolekülen an die extrazelluläre Matrix nehmen, was zu Kontaktverlust und Apoptose führen kann. IGFBP-5 kann aber auch gleichzeitig an EZM und IGFs binden und so einen Pool bilden, der IGFs langsam freisetzt. Es könnte aber auch in hohem Überschuss dafür sorgen, dass IGF vom Rezeptor verdrängt wird (Beattie et al., 2006b). IGFBP-5 besitzt außerdem eine NLS-Sequenz und kann somit in den Zellkern gelangen, wo es an Faktoren der Nuklearrezeptor-Superfamilie binden kann und z.B. die Regulation der Osteoblastenfunktion

kontrollieren kann (Flynn et al., 2009). Insgesamt kann man sagen, dass zahlreiche Faktoren, wie die Beschaffenheit der EZM (z.B. gewebespezifisch), die Verfügbarkeit von Rezeptoren und anderen IGF-Bindungsproteinen und IGFs, sowie das Spektrum an Proteasen eine entscheidende Rolle bei der Wirkung von IGFBP-5 haben. IGFBP-5 hat eine inhibierende Wirkung auf die IGF-Signalübertragung. Es hat einen negativen Einfluss auf die Knochenbildung. So zeigen transgene, IGFBP-5-überexprimierende Mäuse eine vorübergehend verminderte Osteoblastenfunktion und geringeres Knochenvolumen (Devlin et al., 2002). Außerdem wird IGFBP-5 mit Osteoklastogenese assoziiert. Das bedeutet für diese Untersuchung, dass die durch Hypoxie erhöhten IGFBP-5-Level unter bestimmten Bedingungen Knochenabbau verursachen könnten. In kultivierten, humanen Fibroblasten wurde gezeigt, dass über IL-1 β -Aktivierung von NF- κ B auch die Expression von PAPP-A erhöht wird, was für eine verstärkte Degradierung von IGFBP-5 und somit für eine verminderte Blockade der IGF-Signalübertragung spricht (Resch et al., 2006). Außerdem wurde in der gingivalen Sulkusflüssigkeit von Parodontitis-Patienten erhöhte Aktivität von Elastase festgestellt, was diese Annahme noch unterstützt (Rescala et al., 2010). Allerdings können auch die einzelnen Fragmente noch IGF-unabhängige Signale auslösen.

Sowohl unter IGF1-, IL-1 β - als auch Hypoxie-Einfluss waren kaum Änderungen der Expression zu erkennen. Bei längerer Stimulation für 72 Stunden führte IL-1 β zu einer Herunterregulierung um den Faktor 3, Bei kombinierter Gabe dominierte der Effekt von IL-1 β . Unter Hypoxie wurde IGFBP-6 nach 72 Stunden hochreguliert. IGFBP-6 ist bei Endothelzellen unter Hypoxie hochreguliert und führt zu einer IGF-unabhängigen Inhibierung der Angiogenese (Zhang et al., 2011). Da hier die Regulation erst spät erfolgte, könnte es sich hierbei um einen parakrinen Rückkopplungsmechanismus handeln, bei dem das von PDL-Zellen verstärkt sezernierte IGFBP-6 die durch erhöhtes VEGFA stimulierte Angiogenese bremst.

Über IGFBP-6 ist im Vergleich mit den anderen Bindungsproteinen relativ wenig bekannt. Es inhibiert eher die IGF2-induzierten Effekte, wie Proliferation, Differenzierung, Zelladhäsion und Koloniebildung (Firth and Baxter, 2002) und kann das Wachstum diverser IGF2-abhängiger Krebserkrankungen inhibieren (Toretsky and Helman, 1996). Die Affinität zu IGF2 ist etwa 20- bis 100-mal höher als zu IGF1 (Martin et al., 1990; Bach, 1999). Ein IGF-unabhängiger Effekt von IGFBP-6 ist die Migration von Zellen. Dabei ist der p38 MAPK-Weg involviert (Fu et al., 2007). Wenn IGFBP-6 stark überexprimiert wird, fördert es die Apoptose. Es besitzt eine NLS-

Sequenz, welche für die intrazelluläre Wirkung von IGFBP-6 wichtig ist. Interaktionspartner sind hier Nuklearproteine, welche in DNA-Stabilität und -Reparatur involviert sind, wie Ku80, Ku70, Histon H2B und Importin- α (Iosef et al., 2010). IGFBP-6 reguliert in Abhängigkeit vom Zellzyklus die Verfügbarkeit von Ku80 für die DNA-Reparatur (Iosef et al., 2010).

4.5.2.1 IGF1 hat nur geringen Einfluss auf IL-1 β - und/oder Hypoxie-induzierte Änderungen des IGF-Systems auf Transkriptions-Ebene

Hinsichtlich des IGF1-Einflusses auf die Expression von IGF-Systemkomponenten kann man feststellen, dass unter entzündlichen Bedingungen IGF1 einen negativen Einfluss auf die Expression von IGF1R, IRS1, IGFBP-1, IGFBP-2 und -4 hatte. Allerdings erfolgte die Inhibierung erst nach längerer Stimulationsdauer. Unter Hypoxieeinfluss hatte IGF1 lediglich einen negativen Einfluss auf die Expression von IGF1R, IGFBP-3 und IGFBP-6, wobei bei den Bindungsproteinen eine frühe, beim IGF1R eine späte Beeinflussung vorlag. Unter kombinierten Bedingungen von Hypoxie und IL-1 β waren nur IRS1 und IGFBP-2 negativ beeinflusst. Alle diese Effekte könnten auf negative Rückkopplungsmechanismen zur IGF1-Signaltransduktion zurückzuführen sein. Insgesamt ist der IGF1-Einfluss auf mRNA-Ebene gering.

Das IGF-System wird auf Ebene der Genexpression durch die verschiedenen Stimulationen modifiziert. Problematisch wird es hier bei der Beurteilung von Effekten, die durch die verschiedenen Änderungen verursacht sein können. Alle Bindungsproteine üben zahlreiche verschiedene Funktionen aus. Diese multifunktionellen Eigenschaften werden wie oben beschrieben durch eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung und proteolytische Spaltung durch diverse extrazelluläre Proteasen, durch Interaktionen mit Proteinen der extrazellulären Matrix als auch mit verschiedenen membranständigen Rezeptoren bedingt. Hinzu kommt die Tatsache, dass sie IGF-abhängige, aber auch IGF-unabhängige Antworten auslösen können. Alles in allem ist dieses System sehr komplex und es gibt genügend Potenzial für weitere Forschung daran. Hier erscheinen besonders rekombinante Bindungsproteine für Therapieansätze interessant, da durch gezielte Veränderungen in der Struktur ungünstige Modifikationen und Interaktionen ausgeschaltet werden könnten. So ist

es beispielsweise möglich, Protease-resistente, als auch nicht an IGFs oder EZM-Proteine bindende IGFBPs einzusetzen, die eventuell die gewünschte zelluläre Antwort hinsichtlich regenerativer Therapie auslösen.

4.5.3 IGF1, IL-1 β und Hypoxie haben einen Einfluss auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, sowie von HIF-1 α und VEGFA

Unter Hypoxie wurde IL-1 β in PDL-Zellen kaum reguliert. IGF1 sorgte nach mindestens 24-stündiger Inkubation für eine Verringerung der IL-1 β -Expression. Durch Gabe von IL-1 β als Stimulanz war eine deutliche, positive Autoregulation zu erkennen. IGF1 hatte bei längerer Stimulationsdauer eine negative Regulation von IL-1 β zur Folge. Unter hypoxischen Bedingungen führte IGF1 nach 24 Stunden zu einer schwach negativen Regulation von IL-1 β . Bei Stimulation mit IL-1 β zeigte sich unter Hypoxie allerdings eine weniger starke Expressionserhöhung als bei den mit IL-1 β stimulierten Proben im Vergleich mit normoxischen Bedingungen. Außerdem hatte der negative Effekt von IGF1 nach 24 Stunden eine mildernde Wirkung auf den IL-1 β -Effekt. Insgesamt gesehen, ist die Autoinduktion von IL-1 β in PDL-Zellen unter hypoxischen Verhältnissen geringer als unter normoxischen. Dieser Effekt könnte mit der Schnittstelle von Hypoxie und IL-1 β -Signaling, mit den Transkriptionsfaktoren SP-1 und SP-3 erklärt werden. Hypoxie übt einen Einfluss auf die Transkription und Stabilität dieser Faktoren aus, für die es auch in Promotoren einiger Hypoxie-responsiver Gene Bindungsstellen gibt (Cummins and Taylor, 2005). IL-1 β hat über die Aktivierung von NF- κ B Einfluss auf die Expression von SP-3 und kann dadurch die Expression des TGF β -Rezeptors vom Typ II stark unterdrücken (Baugé et al., 2008). Die durch TGF β -Signaling aktivierten SMAD2 und SMAD3 können mit HIF-1 α interagieren und wiederum Hypoxieantworten modifizieren (Cummins and Taylor, 2005). Weitere Schnittstellen wären z.B. CREB und Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie. Es wurde auch beschrieben, dass TGF- β ein potenter Inhibitor von IL-1 β -Effekten ist und auch die IL-1 β -induzierte Transkription von IL-1 β inhibiert. (Derman et al., 1999). Das könnte bedeuten, dass unter Hypoxie stabilisiertes HIF-1 α mit SMADs interagiert und die Transkription von IL-1 β beeinflusst. Hier wäre sogar eine TGF- β -unabhängige Signalübertragung denkbar. IGF1 und IL-1 β können sich gegenseitig beeinflussen. Gemeinsame Zielmoleküle sind z.B. die p38 MAPK und

JNK (O'Connor et al., 2008). So stimuliert z.B. IGF1 die Dephosphorylierung von I κ B in Astrozyten, was die Degradierung und somit die Translokation von NF- κ B in den Nukleus inhibiert (Pons and Torres-Aleman, 2000). Außerdem kann IGF1 auch TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung antagonisieren (Vallée et al., 2003).

IL-6 wurde unter Hypoxie und/oder unter Stimulation mit IL-1 β in PDL-Zellen hochreguliert, wobei der Effekt der Hypoxie über die Zeit abnahm und nach 72 Stunden nicht mehr vorhanden war. Hierbei wird die Expression von IL-6 über die Aktivierung von NF- κ B durch IL-1 β oder Hypoxie stimuliert (Weber et al., 2010). Unter Hypoxie kann zusätzlich noch eine Aktivierung von NF-IL-6 erfolgen, welches mit NF- κ B kooperiert. Auch bereits sekretiertes IL-6 kann NF-IL-6 stimulieren. Unter hypoxischen, inflammatorischen Bedingungen spielt NF-IL-6 eine zentrale Rolle bei der IL-6-Produktion (Semenza, 2000). Bei Stimulation durch IGF1 war IL-6 nur nach 24 und 48 Stunden herunterreguliert. In den untersuchten PDL-Zellen hatte IL-1 β den stärksten Effekt zu den Zeitpunkten 4, 8 und 24 Stunden. Betrachtet man IL-6 unter IL-1 β -Einfluss unter hypoxischen Bedingungen, so scheint sich der Effekt im Vergleich zur normoxischen Kontrolle zeitlich etwas zu verzögern bzw. länger anzuhalten. Die beobachteten positiven Effekte von Hypoxie verstärkten außerdem die Wirkung von IL-1 β . IGF1 hatte in Kombination mit IL-1 β leicht mildernde Effekte auf die IL-6-Expression.

Bei der Expression von HIF-1 α war unter Hypoxie nach 2, 4 und 72 Stunden eine leichte Steigerung zu beobachten. Bei Gabe von IGF1 wurde kein Effekt erzielt, während unter Einfluss von IL-1 β eine Erhöhung der Expression über die Zeit zu erkennen war. Die kombinierte Gabe von IGF1 und IL-1 β führte zu einem leicht abgeschwächten Effekt im Vergleich zur IL-1 β -Stimulation. Unter hypoxischen Verhältnissen zeigte sich für die Stimulation mit IGF1 in den PDL-Zellen ein ähnliches Bild wie unter normoxischen Bedingungen. IGF1 hatte hier erst nach 72 Stunden einen negativen Einfluss auf die Expression von HIF-1 α , welche ansonsten unverändert blieb. Stimulation mit IL-1 β führte auch unter hypoxischen Verhältnissen zu einer positiven Regulation. Die Hypoxie selbst hatte nur nach 2, 4 und 72 Stunden eine Expressionserhöhung zur Folge, was sich auch in Kombination mit IL-1 β und/oder IGF1 zusätzlich bemerkbar macht, vergleicht man mit der unstimulierten, normoxischen Kontrolle. Hypoxie hatte auf die mRNA-Expression von HIF-1 α nur

einen geringen Einfluss. Sie stabilisiert eher vorhandenes HIF-1 α auf Proteinebene und führt zur Translokation in den Zellkern (Araldi and Schipani, 2010). Das ist gut auf den Immunfluoreszenzbildern (**Abb. 17**) zu erkennen. Es ist bekannt, dass IL-1 β die Expression von HIF-1 α erhöht (Argaw et al., 2006).

Unter Einfluss von Hypoxie war eine Expressionssteigerung von VEGFA zu verzeichnen. Dies ist nicht verwunderlich, da durch die Hypoxie HIF-1 α stabilisiert wird und VEGFA ein gut untersuchtes HIF-1 α -induziertes Gen ist (Brahimi-Horn et al., 2007). IL-1 β zeigte nur nach 2 Stunden einen positiven Einfluss. Es wird, wie oben beschrieben, durch IL-1 β zwar mehr HIF-1 α transkribiert, allerdings ist dieses ohne hypoxische Verhältnisse weniger stabil. So ist nicht unbedingt eine gesteigerte Expression von VEGFA zu erwarten. Bei Gabe von IGF1 war anfänglich eine Erhöhung (2, 4 h) und nach 24 Stunden eine schwache Verringerung der VEGFA-Expression mit folgender leichter Erhöhung zu erkennen. Eine Kombination von IGF1 und IL-1 β führte nur anfänglich nach 2 und 4 Stunden zu einer Erhöhung der Expression. Der negative Einfluss von IGF1 war nach 24 Stunden nicht mehr zu beobachten. Inkubierte man die PDL-Zellen unter hypoxischen Bedingungen mit IL-1 β , so zeigte sich eine Erhöhung der VEGFA-Expression nach 24 Stunden bezogen auf die hypoxische Kontrolle. Bezieht man Hypoxie in Verbindung mit IL-1 β auf die unstimulierte, normoxische Kontrolle, so erkennt man eine noch deutlicher gesteigerte Expression. IL-1 β sorgt für erhöhte Expression von HIF-1 α , Hypoxie stabilisiert dieses und sorgt für die Translokation in den Kern, so dass Zielgene, wie z.B. VEGFA exprimiert werden (Argaw et al., 2006; Brahimi-Horn et al., 2007). In einer anderen Arbeit an einer ovariellen Tumorzelllinie wurde gezeigt, dass IL-1 β auch die Translation von HIF-1 α anregen kann (Frede et al., 2005). Das könnte eine Erklärung für die kooperative Erhöhung der VEGFA-Expression unter IL-1 β -Einfluss und Hypoxie sein.

Die Expression von VEGFA ist entscheidend durch HIF-1 α beeinflusst. IGF1 hatte zu frühen Stimulationszeitpunkten einen positiven Effekt auf die VEGFA-Expression unter entzündlichen Bedingungen alleine als auch unter hypoxischen, inflammatorischen Bedingungen. VEGFA übt im Allgemeinen einen positiven Effekt auf die Angiogenese aus (Xu et al., 2011).

4.5.3.1 IGF1 hat eine leicht mildernde Wirkung auf die IL-1 β - und Hypoxie-induzierte Expressionserhöhung von pro-inflammatorischen Zytokinen

IL-6, HIF-1 α und VEGFA waren unter hypoxischen Bedingungen in PDL-Zellen positiv reguliert. Dies führt zu einer Rekrutierung von Immunzellen. Es kann Angiogenese hervorgerufen werden. IL-6 hat Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten und auf die Antikörperproduktion in B-Lymphozyten. Es hat außerdem einen positiven Einfluss auf die Osteoklastenaktivierung. Der oxidative Stress kann unter inflammatorischen, hypoxischen Bedingungen stärker werden, da IL-1 β eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Folge haben kann (Yang et al., 2007). Die Kombination mit IGF1 zeigte eine leichte Minderung der gesteigerten Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Deshalb könnte hier indirekt ein negativer Einfluss auf die Angiogenese, aber auch ein positiver Einfluss auf die Erhaltung des Alveolarknochens ausgeübt werden.

4.6 IGF1 ELISA

Hier zeigte sich, dass IGF1 in nur geringsten Mengen in den Überständen vorliegt. Eine Ansäuerung mit anschließender Blockierung von IGFBPs mit IGF2 brachte nur bei den unstimulierten, normoxischen und hypoxischen Proben erhöhte Messwerte. Bei den mit IL-1 β stimulierten Proben, bei denen auf Genebene nach 24 Stunden Stimulation eine erhöhte IGF1-Expression zu beobachten war, konnten durch die Ansäuerung keine verbesserten Werte erreicht werden. Das würde bedeuten, dass bei den unstimulierten Zellen mehr IGF1 im Überstand vorhanden ist als bei den mit IL-1 β stimulierten Proben. Gleichzeitig würde es bedeuten, dass bei den unstimulierten normoxischen als auch bei den unstimulierten hypoxischen Kontrollen mehr funktionsfähige IGFBPs im Überstand vorhanden sein sollten. Dies könnte z.B. durch eine geringere Aktivität von diversen Proteasen hervorgerufen worden sein. Durch IL-1 β werden verschiedene Proteasen positiv beeinflusst. Hier sind Matrix-Metalloproteasen (z.B. MMP-2, MMP-3) sowie PAPP-A zu nennen, welche auch IGFBPs spalten könnten (Nakaya et al., 1997; Kang et al., 2003; Resch et al., 2006; Gosset et al., 2010). Dadurch würde weniger gebundenes IGF1 im Überstand vorliegen. Aufgrund der allgemein geringen Mengen an nachweisbarem IGF1 (~3

pM) sind kaum biologische Effekte zu erwarten. Unter Einfluss von Hypoxie und/oder IL-1 β ist daher keine parakrine oder autokrine Stimulation der PDL-Zellen und der benachbarten Gewebe zu erwarten. Lediglich unter Einfluss von IL-1 β könnte über die wahrscheinliche Zerstörung von IGFBPs ein Einfluss auf das PDL ausgeübt werden, indem möglicherweise von anderen Zelltypen produziertes oder exogen zugeführtes IGF1 ungehindert wirken kann.

4.7 Zusammenfassung:

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PDL-Zellen einen sehr geringen Sauerstoffverbrauch haben. Dieser ist nicht durch IGF1 beeinflussbar. Im Gegensatz dazu führt IL-1 β zu einem verminderten Sauerstoffbedarf. Dieser Effekt ist nicht durch IGF1 umkehrbar. Hypoxie mit 0,5 % Sauerstoff im Inkubationsgas fördert die Proliferation der Zellen. IL-1 β hingegen hemmt die Proliferation bzw. fördert Apoptose. IGF1 hat hier keinen großen Einfluss. Bei den Wundheilungsexperimenten hingegen konnte IGF1 den hemmenden Effekt von IL-1 β umkehren. Aufgrund des schwachen Einflusses von IGF1 auf den IL-1 β -Effekt hinsichtlich der Proliferation könnte bei der Regeneration des Zellrasens eine erhöhte Migration der Zellen durch IGF1 eine Rolle spielen. Unter entzündlichen und hypoxischen Bedingungen, wie in diesem Fall z.B. bei Parodontitis, werden diverse Gene reguliert. Die aufgezeigten Änderungen können zur Begünstigung von Angiogenese, Lymphangiogenese, Osteoklastenaktivierung, zur Hemmung der Osteoblastenfunktion, zum Integritätsverlust des PDLs, sowie zu Zerstörung der extrazellulären Matrix beitragen. IGF1 sorgt auf der Transkriptionsebene nur für leichte Veränderungen der Genexpression. Der beobachtete Einfluss könnte allerdings zur Hemmung des Knochenverlustes, zur Hemmung der Angiogenese und zu einer Milderung der Entzündungsreaktion verhelfen. Die Daten des IGF1-ELISA zeigen, dass kaum detektierbare Mengen an endogenem, freiem IGF1 sezerniert werden. Das entspricht auch den relativ geringen Werten der PCR. Außerdem bleibt die Frage, ob diese geringen Mengen an IGF1 überhaupt aktiv sind, da eventuell unter hypoxischen Bedingungen in und außerhalb der Zelle die Disulfidbrücken der IGF1-Moleküle nicht aufgebaut werden können.

Die Beobachtungen auf Transkriptionsebene lassen sich nicht einfach auf Proteinebene übertragen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, in welcher Weise IGF1 die Proteinsynthese der untersuchten Gene beeinflusst, da IGF1 über den mTOR-Weg wichtige Faktoren für die Proteinsynthese aktiviert. Dazu gehören das ribosomale Protein S6 und der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E).

Literaturverzeichnis

- Abcouwer, S. F., Shanmugam, S., Gomez, P. F., Shushanov, S., Barber, A. J., Lanoue, K. F., Quinn, P. G., Kester, M., and Gardner, T. W. (2008). Effect of IL-1 β on survival and energy metabolism of R28 and RGC-5 retinal neurons. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* **49**, 5581-5592.
- Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P., and Ward, C. W. (2000). Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci* **57**, 1050-1093.
- Amaar, Y. G., Thompson, G. R., Linkhart, T. A., Chen, S.-T., Baylink, D. J., and Mohan, S. (2002). Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). *J. Biol. Chem* **277**, 12053-12060.
- Amemiya, H., Matsuzaka, K., Kokubu, E., Ohta, S., and Inoue, T. (2008). Cellular responses of rat periodontal ligament cells under hypoxia and re-oxygenation conditions in vitro. *J. Periodont. Res* **43**, 322-327.
- Amemiya, K., Kaneko, Y., Muramatsu, T., Shimono, M., and Inoue, T. (2003). Pulp cell responses during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Eur. J. Oral Sci* **111**, 332-338.
- Ancrile, B., Lim, K.-H., and Counter, C. M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev* **21**, 1714-1719.
- Andress, D. L. (1998). Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates phosphorylation of the IGFBP-5 receptor. *Am. J. Physiol* **274**, E744-750.
- Andress, D. L., Loop, S. M., Zapf, J., and Kiefer, M. C. (1993). Carboxy-truncated insulin-like growth factor binding protein-5 stimulates mitogenesis in osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **195**, 25-30.
- Annunziata, M., Granata, R., and Ghigo, E. (2010). The IGF system. *Acta Diabetol*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042815> [Accessed February 14, 2011].
- Aragonés, J., Jones, D. R., Martin, S., San Juan, M. A., Alfranca, A., Vidal, F., Vara, A., Mérida, I., and Landázuri, M. O. (2001). Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension. *J. Biol. Chem* **276**, 10548-10555.
- Araldi, E., and Schipani, E. (2010). Hypoxia, HIFs and bone development. *Bone* **47**, 190-196.
- Argaw, A. T., Zhang, Y., Snyder, B. J., Zhao, M.-L., Kopp, N., Lee, S. C., Raine, C. S., Brosnan, C. F., and John, G. R. (2006). IL-1 β regulates blood-brain

- barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J. Immunol* 177, 5574-5584.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol* 4, 1-6.
- Arnsdorf, E. J., Tummala, P., Castillo, A. B., Zhang, F., and Jacobs, C. R. (2010). The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. *J Biomech* 43, 2881-2886.
- Arsham, A. M., and Neufeld, T. P. (2006). Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr. Opin. Cell Biol* 18, 589-597.
- Bach, L. A. (1999). Insulin-like growth factor binding protein-6: the "forgotten" binding protein? *Horm. Metab. Res* 31, 226-234.
- Baek, J. H., Liu, Y. V., McDonald, K. R., Wesley, J. B., Hubbi, M. E., Byun, H., and Semenza, G. L. (2007). Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Biol. Chem* 282, 23572-23580.
- Bartold, P. M., and Narayanan, A. S. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol. 2000* 40, 29-49.
- Basdra, E. K., and Komposch, G. (1997). Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *The European Journal of Orthodontics* 19, 615 -621.
- Baugé, C., Beauchef, G., Leclercq, S., Kim, S. J., Pujol, J. P., Galéra, P., and Boumédiène, K. (2008). NFkappaB mediates IL-1beta-induced down-regulation of TbetaRII through the modulation of Sp3 expression. *J. Cell. Mol. Med* 12, 1754-1766.
- Baxter, R. C. (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 278, E967-976.
- Baxter, R. C., and Martin, J. L. (1989). Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function. *Prog. Growth Factor Res* 1, 49-68.
- Beattie, J., Allan, G. J., Lochrie, J. D., and Flint, D. J. (2006a). Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis. *Biochem. J* 395, 1-19.
- Beattie, J., Allan, G. J., Lochrie, J. D., and Flint, D. J. (2006b). Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis. *Biochem. J* 395, 1-19.
- Belletti, B., Drakas, R., Morrione, A., Tu, X., Prisco, M., Yuan, T., Casaburi, I., and Baserga, R. (2002). Regulation of Id1 protein expression in mouse embryo fibroblasts by the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Exp. Cell Res* 277, 107-118.

- Di Benedetto, A., Watkins, M., Grimston, S., Salazar, V., Donsante, C., Mbalaviele, G., Radice, G. L., and Civitelli, R. (2010). N-cadherin and cadherin 11 modulate postnatal bone growth and osteoblast differentiation by distinct mechanisms. *J. Cell. Sci* 123, 2640-2648.
- Berezow, A. B., and Darveau, R. P. (2011). Microbial shift and periodontitis. *Periodontol.* 2000 55, 36-47.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 22, 4082-4090.
- Bhaumick, B., Bala, R. M., and Hollenberg, M. D. (1981). Somatomedin receptor of human placenta: solubilization, photolabeling, partial purification, and comparison with insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78, 4279-4283.
- Böni-Schnetzler, M., Schmid, C., Mary, J. L., Zimmerli, B., Meier, P. J., Zapf, J., Schwander, J., and Froesch, E. R. (1990). Insulin regulates the expression of the insulin-like growth factor binding protein 2 mRNA in rat hepatocytes. *Mol. Endocrinol* 4, 1320-1326.
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr. Opin. Cell Biol* 19, 223-229.
- Breier, B. H., Gallaher, B. W., and Gluckman, P. D. (1991). Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J. Endocrinol* 128, 347-357.
- Brigelius-Flohé, R., Banning, A., Kny, M., and Böhl, G.-F. (2004). Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch. Biochem. Biophys* 423, 66-73.
- Brown, A. L., and Rechler, M. M. (1990). Cloning of the rat insulin-like growth factor-binding protein-2 gene and identification of a functional promoter lacking a TATA box. *Mol. Endocrinol* 4, 2039-2051.
- Bruick, R. K., and McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Bunn, H. F., and Poyton, R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev* 76, 839-885.
- Busby, W. H., Jr, Klapper, D. G., and Clemmons, D. R. (1988). Purification of a 31,000-dalton insulin-like growth factor binding protein from human amniotic fluid. Isolation of two forms with different biologic actions. *J. Biol. Chem* 263, 14203-14210.
- Butler, A. A., and LeRoith, D. (2001). Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142, 1685-1688.
- Chelius, D., Baldwin, M. A., Lu, X., and Spencer, E. M. (2001). Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4. *J. Endocrinol* 168, 283-296.

- Cheng, H. L., Shy, M., and Feldman, E. L. (1999). Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-5 expression during Schwann cell differentiation. *Endocrinology* 140, 4478-4485.
- Chernausek, S. D., Jacobs, S., and Van Wyk, J. J. (1981). Structural similarities between human receptors for somatomedin C and insulin: analysis by affinity labeling. *Biochemistry* 20, 7345-7350.
- Chitnis, M. M., Yuen, J. S. P., Protheroe, A. S., Pollak, M., and Macaulay, V. M. (2008). The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin. Cancer Res* 14, 6364-6370.
- Chowdhury, R., Hardy, A., and Schofield, C. J. (2008). The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chem Soc Rev* 37, 1308-1319.
- Chun, Y.-S., Kim, M.-S., and Park, J.-W. (2002). Oxygen-dependent and - independent regulation of HIF-1 α . *J. Korean Med. Sci* 17, 581-588.
- Clemmons, D. R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 45-62.
- Clemmons, D. R. (1998). Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol. Cell. Endocrinol* 140, 19-24.
- Clemmons, D. R. (2001). Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships. *Endocr. Rev* 22, 800-817.
- Cohick, W. S., and Clemmons, D. R. (1993). The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol* 55, 131-153.
- Conover, C. A. (1995). Insulin-like growth factor binding protein proteolysis in bone cell models. *Prog. Growth Factor Res* 6, 301-309.
- Conover, C. A. (2008). Insulin-like growth factor-binding proteins and bone metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 294, E10-14.
- Cooke, R. M., Harvey, T. S., and Campbell, I. D. (1991). Solution structure of human insulin-like growth factor 1: a nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics study. *Biochemistry* 30, 5484-5491.
- Crookart, N., Jordan, B. F., Baudalet, C., Cron, G. O., Hotton, J., Radermacher, K., Grégoire, V., Beghein, N., Martinive, P., Bouzin, C., et al. (2007). Glucocorticoids modulate tumor radiation response through a decrease in tumor oxygen consumption. *Clin. Cancer Res* 13, 630-635.
- Cummins, E. P., and Taylor, C. T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450, 363-371.
- Czyzyk-Krzeska, M. F. (1997). Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia. *Respir Physiol* 110, 99-111.

- Daughaday, W. H., and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev* 10, 68-91.
- Daughaday, W. H., Kapadia, M., and Mariz, I. (1987). Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J. Lab. Clin. Med* 109, 355-363.
- Daughaday, W. H., Mariz, I. K., and Blethen, S. L. (1980). Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 51, 781-788.
- De, W., Czernichow, P., and Asfari, M. (1996). Discordant Regulation of insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding protein-2 gene expression in a rat beta-cell line. *Growth Regul* 6, 83-87.
- Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., and Forbes, B. E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 421-439.
- Deo, V., and Bhongade, M. L. (2010). Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dent Today* 29, 60-62, 64-66; quiz 68-69.
- Derman, S. G., Kol, S., Ben-Shlomo, I., Resnick, C. E., Rohan, R. M., and Adashi, E. Y. (1999). Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of interleukin-1beta action in whole ovarian dispersates. *J. Endocrinol* 160, 415-423.
- Derycke, L., Morbidelli, L., Ziche, M., De Wever, O., Bracke, M., and Van Aken, E. (2006). Soluble N-cadherin fragment promotes angiogenesis. *Clin. Exp. Metastasis* 23, 187-201.
- Deschner, J., and Jepsen, S. (2011). Wechselwirkungen zwischen parodontalen und systemischen Erkrankungen. *Zahnmedizin up2date* 5, 183-204.
- Devlin, R. D., Du, Z., Buccilli, V., Jorgetti, V., and Canalis, E. (2002). Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor binding protein-5 display transiently decreased osteoblastic function and osteopenia. *Endocrinology* 143, 3955-3962.
- Ding, J., Ghali, O., Lencel, P., Broux, O., Chauveau, C., Devedjian, J. C., Hardouin, P., and Magne, D. (2009). TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci* 84, 499-504.
- Doherty, P., Williams, G., and Williams, E. J. (2000). CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol. Cell. Neurosci* 16, 283-295.
- Drop, S. L., Schuller, A. G., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Groffen, C., Brinkman, A., and Zwarthoff, E. C. (1992). Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Regul* 2, 69-79.

- Duan, C., Liimatta, M. B., and Bottum, O. L. (1999). Insulin-like growth factor (IGF)-I regulates IGF-binding protein-5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B/Akt, and p70 S6 kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem* 274, 37147-37153.
- Dwivedi, A., Slater, S. C., and George, S. J. (2009). MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby beta-catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc. Res* 81, 178-186.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J. H., Masiarz, F., Kan, Y. W., and Goldfine, I. D. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40, 747-758.
- Eltzschig, H. K., and Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med* 364, 656-665.
- Endo, H., Murata, K., Mukai, M., Ishikawa, O., and Inoue, M. (2007). Activation of insulin-like growth factor signaling induces apoptotic cell death under prolonged hypoxia by enhancing endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 67, 8095-8103.
- Ernst, C. W., and White, M. E. (1996). Hormonal regulation of IGF-binding protein-2 expression in proliferating C2C12 myoblasts. *J. Endocrinol* 149, 417-429.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G., and Semenza, G. L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59, 3915-3918.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 8204-8209.
- Firth, S. M., and Baxter, R. C. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev* 23, 824-854.
- Flynn, R. S., Mahavadi, S., Murthy, K. S., Kellum, J. M., and Kuemmerle, J. F. (2009). Insulin-like growth factor-binding protein-5 stimulates growth of human intestinal muscle cells by activation of G α _{i3}. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 297, G1232-1238.
- Fowden, A. L., Giussani, D. A., and Forhead, A. J. (2006). Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 21, 29-37.
- Fowlkes, J. L., Thrailkill, K. M., Serra, D. M., Suzuki, K., and Nagase, H. (1995). Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. *Prog. Growth Factor Res* 6, 255-263.
- Frede, S., Freitag, P., Otto, T., Heilmaier, C., and Fandrey, J. (2005). The proinflammatory cytokine interleukin 1 β and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res* 65, 4690-4697.

- Fu, P., Thompson, J. A., and Bach, L. A. (2007). Promotion of cancer cell migration: an insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-6. *J. Biol. Chem* 282, 22298-22306.
- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y. D., Ellis, L. M., and Semenza, G. L. (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J. Biol. Chem* 277, 38205-38211.
- Fullmer, H. M., Sheetz, J. H., and Narkates, A. J. (1974). Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J. Oral Pathol* 3, 291-316.
- Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J. Dent. Res* 89, 1349-1363.
- Ghosh, P., Dahms, N. M., and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 4, 202-212.
- Gibson, J. M., Aplin, J. D., White, A., and Westwood, M. (2001). Regulation of IGF bioavailability in pregnancy. *Mol. Hum. Reprod* 7, 79-87.
- Gleeson, L. M., Chakraborty, C., McKinnon, T., and Lala, P. K. (2001). Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 2484-2493.
- Gosset, M., Pigenet, A., Salvat, C., Berenbaum, F., and Jacques, C. (2010). Inhibition of matrix metalloproteinase-3 and -13 synthesis induced by IL-1beta in chondrocytes from mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J. Immunol* 185, 6244-6252.
- Götz, W., Heinen, M., Lossdörfer, S., and Jäger, A. (2006a). Immunohistochemical localization of components of the insulin-like growth factor system in human permanent teeth. *Arch. Oral Biol* 51, 387-395.
- Götz, W., Krüger, U., Ragotzki, S., Lossdörfer, S., and Jäger, A. (2001). Immunohistochemical localization of components of the insulin-like growth factor-system in human deciduous teeth. *Connect. Tissue Res* 42, 291-302.
- Götz, W., Kunert, D., Zhang, D., Kavarizadeh, A., Lossdörfer, S., and Jäger, A. (2006b). Insulin-like growth factor system components in the periodontium during tooth root resorption and early repair processes in the rat. *Eur. J. Oral Sci* 114, 318-327.
- Götz, W., Lossdörfer, S., Krüger, U., Braumann, B., and Jäger, A. (2003). Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II and its binding protein-6 in human epithelial cells of Malassez. *Eur. J. Oral Sci* 111, 26-33.
- Graves, D. T., Oates, T., and Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 3.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547019> [Accessed July 6, 2011].
- Grimberg, A., Coleman, C. M., Burns, T. F., Himelstein, B. P., Koch, C. J., Cohen, P., and El-Deiry, W. S. (2005). p53-Dependent and p53-independent induction of insulin-like growth factor binding protein-3 by deoxyribonucleic acid damage and hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **90**, 3568-3574.
- Guzy, R. D., and Schumacker, P. T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol* **91**, 807-819.
- Hamidouche, Z., Fromigué, O., Ringe, J., Häupl, T., and Marie, P. J. (2010). Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation. *BMC Cell Biol* **11**, 44.
- Hansen, A. E., Kristensen, A. T., Law, I., Jørgensen, J. T., and Engelholm, S. A. (2011). Hypoxia-inducible factors--regulation, role and comparative aspects in tumourigenesis. *Vet Comp Oncol* **9**, 16-37.
- Haÿ, E., Laplantine, E., Geoffroy, V., Frain, M., Kohler, T., Müller, R., and Marie, P. J. (2009a). N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol. Cell. Biol* **29**, 953-964.
- Haÿ, E., Nouraud, A., and Marie, P. J. (2009b). N-cadherin negatively regulates osteoblast proliferation and survival by antagonizing Wnt, ERK and PI3K/Akt signalling. *PLoS ONE* **4**, e8284.
- Henneman, S., Von den Hoff, J. W., and Maltha, J. C. (2008). Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* **30**, 299-306.
- Hoffmann, T., Micheelis, W., Schiffner, U., (IDZ), I. der D. Z., and (Köln), I. der D. Z. (2006). Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV): neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005 (Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV).
- Hu, Z., Lee, I. H., Wang, X., Sheng, H., Zhang, L., Du, J., and Mitch, W. E. (2007). PTEN expression contributes to the regulation of muscle protein degradation in diabetes. *Diabetes* **56**, 2449-2456.
- Huang, C.-F., Lira, C., Chu, K., Bilen, M. A., Lee, Y.-C., Ye, X., Kim, S. M., Ortiz, A., Wu, F.-L. L., Logothetis, C. J., et al. (2010). Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res* **70**, 4580-4589.
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., and Bunn, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem* **271**, 32253-32259.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain

- via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 7987-7992.
- Huang, S., Lu, F., Zhang, Z., Yang, X., and Chen, Y. (2011a). The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1 α in rat experimental periodontitis. *J. Periodontol* **82**, 934-941.
- Huang, Y., Corpas, L. S., Martens, W., Jacobs, R., and Lambrichts, I. (2011b). Histomorphological study of myelinated nerve fibres in the periodontal ligament of human canine. *Acta Odontol Scand*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395471> [Accessed May 26, 2011].
- Hubbard, S. R. (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* **16**, 5572-5581.
- Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R. G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev* **20**, 761-787.
- Hwang, Y. S., Jeong, M., Park, J. S., Kim, M. H., Lee, D. B., Shin, B. A., Mukaida, N., Ellis, L. M., Kim, H. R., Ahn, B. W., et al. (2004). Interleukin-1 β stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncogene* **23**, 6603-6611.
- Iida, K., Takeda-Kawaguchi, T., Tezuka, Y., Kunisada, T., Shibata, T., and Tezuka, K.-ichi (2010). Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch. Oral Biol* **55**, 648-654.
- Iosef, C., Gkourasas, T., Jia, C. Y. H., Li, S. S.-C., and Han, V. K. M. (2008). A functional nuclear localization signal in insulin-like growth factor binding protein-6 mediates its nuclear import. *Endocrinology* **149**, 1214-1226.
- Iosef, C., Vilks, G., Gkourasas, T., Lee, K.-J., Chen, B. P. C., Fu, P., Bach, L. A., Lajoie, G., Gupta, M. B., Li, S. S. C., et al. (2010). Insulin-like growth factor binding protein-6 (IGFBP-6) interacts with DNA-end binding protein Ku80 to regulate cell fate. *Cell. Signal* **22**, 1033-1043.
- Jacobs, S., Kull, F. C., Jr, Earp, H. S., Svoboda, M. E., Van Wyk, J. J., and Cuatrecasas, P. (1983). Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the beta-subunit of its own receptor. *J. Biol. Chem* **258**, 9581-9584.
- Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J., and Kim, K. W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* **111**, 709-720.
- Jogie-Brahim, S., Feldman, D., and Oh, Y. (2009). Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocr. Rev* **30**, 417-437.
- Jones, J. I., and Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev* **16**, 3-34.
- Jones, J. I., Busby, W. H., Wright, G., Smith, C. E., Kimack, N. M., and Clemmons, D. R. (1993a). Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth

- factor binding protein-1. Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *J. Biol. Chem* 268, 1125-1131.
- Jones, J. I., Gockerman, A., Busby, W. H., Jr, Camacho-Hubner, C., and Clemmons, D. R. (1993b). Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J. Cell Biol* 121, 679-687.
- Jönsson, D., Nebel, D., Bratthall, G., and Nilsson, B.-O. (2011). The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J. Periodont. Res* 46, 153-157.
- Kaelin, W. G., Jr, and Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393-402.
- Kajimura, S., Aida, K., and Duan, C. (2005). Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mediates hypoxia-induced embryonic growth and developmental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 1240-1245.
- Kajimura, S., and Duan, C. (2007). Insulin-like growth factor-binding protein-1: an evolutionarily conserved fine tuner of insulin-like growth factor action under catabolic and stressful conditions. *J Fish Biology* 71, 309-325.
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 17, 6573-6586.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (2000). Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 10430-10435.
- Kang, B.-S., Park, Y.-G., Cho, J.-Y., Kim, J.-K., Lee, T.-K., Kim, D.-W., Gu, Y.-H., Suzuki, I., Chang, Y.-C., and Kim, C.-H. (2003). Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induce collagenolysis and bone resorption by regulation of matrix metalloproteinase-2 in mouse calvarial bone cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 25, 347-364.
- Kaur, J., Dhaunsi, G. S., and Turner, R. B. (2004). Interleukin-1 and nitric oxide increase NADPH oxidase activity in human coronary artery smooth muscle cells. *Med Princ Pract* 13, 26-29.
- Kawar, N., Gajendrareddy, P. K., Hart, T. C., Nouneh, R., Maniar, N., and Alrayyes, S. (2011). Periodontal disease for the primary care physician. *Dis Mon* 57, 174-183.
- Kelley, K. M., Oh, Y., Gargosky, S. E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D. M., and Rosenfeld, R. G. (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 28, 619-637.
- Kiepe, D., Ciarmatori, S., Hoeflich, A., Wolf, E., and Tönshoff, B. (2005). Insulin-like growth factor (IGF)-I stimulates cell proliferation and induces IGF binding

- protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 gene expression in cultured growth plate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Endocrinology* 146, 3096-3104.
- Kinane, D. F., and Mark Bartold, P. (2007). Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol.* 2000 43, 278-293.
- Kitase, Y., Yokozeki, M., Fujihara, S., Izawa, T., Kuroda, S., Tanimoto, K., Moriyama, K., and Tanaka, E. (2009). Analysis of gene expression profiles in human periodontal ligament cells under hypoxia: the protective effect of CC chemokine ligand 2 to oxygen shortage. *Arch. Oral Biol* 54, 618-624.
- Kuemmerle, J. F. (2000). Endogenous IGF-I regulates IGF binding protein production in human intestinal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 278, G710-717.
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol* 67, 225-257.
- Kurmasheva, R. T., and Houghton, P. J. (2006). IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1766, 1-22.
- Lai, Y., Qiao, M., Song, M., Weintraub, S. T., and Shiio, Y. (2011). Quantitative Proteomics Identifies the Myb-Binding Protein p160 as a Novel Target of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor. *PLoS ONE* 6, e16975.
- Lang, C. H., Nystrom, G. J., and Frost, R. A. (1999). Regulation of IGF binding protein-1 in hep G2 cells by cytokines and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol* 276, G719-727.
- Lappin, D. F., Koulouri, O., Radvar, M., Hodge, P., and Kinane, D. F. (1999). Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. *J. Clin. Periodontol* 26, 183-189.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., and Semenza, G. L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol* 21, 3995-4004.
- Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., Hays, L. G., Yates, J. R., 3rd, and Conover, C. A. (1999). The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 3149-3153.
- Lee, K.-W., Cobb, L. J., Paharkova-Vatchkova, V., Liu, B., Milbrandt, J., and Cohen, P. (2007). Contribution of the orphan nuclear receptor Nur77 to the apoptotic action of IGFBP-3. *Carcinogenesis* 28, 1653-1658.
- Lemmey, A. B., Glassford, J., Flick-Smith, H. C., Holly, J. M., and Pell, J. M. (1997). Differential regulation of tissue insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3, IGF-I and IGF type 1 receptor mRNA levels, and serum IGF-I and IGFBP concentrations by growth hormone and IGF-I. *J. Endocrinol* 154, 319-328.

- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C. T., Jr (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev* 16, 143-163.
- Li, H., and Lin, X. (2008). Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* 41, 1-8.
- Lian, J. B., Stein, G. S., Stewart, C., Puchacz, E., Mackowiak, S., Aronow, M., Von Deck, M., and Shalhoub, V. (1989). Osteocalcin: characterization and regulated expression of the rat gene. *Connect. Tissue Res* 21, 61-68; discussion 69.
- Liu, B., Lee, H. Y., Weinzimer, S. A., Powell, D. R., Clifford, J. L., Kurie, J. M., and Cohen, P. (2000). Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J. Biol. Chem* 275, 33607-33613.
- Liu, B., Lee, K.-W., Anzo, M., Zhang, B., Zi, X., Tao, Y., Shiry, L., Pollak, M., Lin, S., and Cohen, P. (2007a). Insulin-like growth factor-binding protein-3 inhibition of prostate cancer growth involves suppression of angiogenesis. *Oncogene* 26, 1811-1819.
- Liu, Y. V., Baek, J. H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R. N., and Semenza, G. L. (2007b). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol. Cell* 25, 207-217.
- Löfstedt, T., Jögi, A., Sigvardsson, M., Gradin, K., Poellinger, L., Pålman, S., and Axelson, H. (2004). Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem* 279, 39223-39231.
- Lossdörfer, S., Kraus, D., Abuduwali, N., and Jäger, A. (2011). Intermittent administration of PTH(1-34) regulates the osteoblastic differentiation of human periodontal ligament cells via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways in vitro. *J. Periodont. Res* 46, 318-326.
- Lu, X., and Kang, Y. (2010). Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin. Cancer Res* 16, 5928-5935.
- Ma, J., Sawai, H., Matsuo, Y., Ochi, N., Yasuda, A., Takahashi, H., Wakasugi, T., Funahashi, H., Sato, M., and Takeyama, H. (2010). IGF-1 mediates PTEN suppression and enhances cell invasion and proliferation via activation of the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J. Surg. Res* 160, 90-101.
- Mahon, P. C., Hirota, K., and Semenza, G. L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15, 2675-2686.
- Maile, L. A., and Holly, J. M. (1999). Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation. *Growth Horm. IGF Res* 9, 85-95.

- Majmundar, A. J., Wong, W. J., and Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* 40, 294-309.
- Maki, R. G. (2010). Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J. Clin. Oncol* 28, 4985-4995.
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marelli, M. M., Moretti, R. M., Procacci, P., Motta, M., and Limonta, P. (2006). Insulin-like growth factor-I promotes migration in human androgen-independent prostate cancer cells via the α v β 3 integrin and PI3-K/Akt signaling. *Int. J. Oncol* 28, 723-730.
- Martin, J. L., Willetts, K. E., and Baxter, R. C. (1990). Purification and properties of a novel insulin-like growth factor-II binding protein from transformed human fibroblasts. *J. Biol. Chem* 265, 4124-4130.
- Martin-Kleiner, I., and Gall Troselj, K. (2010). Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in carcinogenesis. *Cancer Lett* 289, 11-22.
- Masset, A., Staszyk, C., and Gasse, H. (2006). The blood vessel system in the periodontal ligament of the equine cheek teeth--part I: The spatial arrangement in layers. *Ann. Anat* 188, 529-533.
- McCulloch, C. A., Lekic, P., and McKee, M. D. (2000). Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol.* 2000 24, 56-72.
- Melsen, B. (2001). Tissue reaction to orthodontic tooth movement--a new paradigm. *Eur J Orthod* 23, 671-681.
- Mendes, A. F., Caramona, M. M., Carvalho, A. P., and Lopes, M. C. (2003). Hydrogen peroxide mediates interleukin-1 β -induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol. Toxicol* 19, 203-214.
- Metzen, E., Wolff, M., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1995). Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir Physiol* 100, 101-106.
- Migita, T., Narita, T., Asaka, R., Miyagi, E., Nagano, H., Nomura, K., Matsuura, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., et al. (2010). Role of insulin-like growth factor binding protein 2 in lung adenocarcinoma: IGF-independent antiapoptotic effect via caspase-3. *Am. J. Pathol* 176, 1756-1766.
- Milasincic, D. J., Calera, M. R., Farmer, S. R., and Pilch, P. F. (1996). Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Mol. Cell. Biol* 16, 5964-5973.

- Miyakoshi, N., Richman, C., Kasukawa, Y., Linkhart, T. A., Baylink, D. J., and Mohan, S. (2001). Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J. Clin. Invest* 107, 73-81.
- Mohan, S., and Baylink, D. J. (2002). IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J. Endocrinol* 175, 19-31.
- Mohan, S., and Baylink, D. J. (1996). Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption. *Horm. Res* 45 Suppl 1, 59-62.
- Morgan, D. O., Edman, J. C., Standring, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A., and Rutter, W. J. (1987). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329, 301-307.
- Motohira, H., Hayashi, J., Tatsumi, J., Tajima, M., Sakagami, H., and Shin, K. (2007). Hypoxia and reoxygenation augment bone-resorbing factor production from human periodontal ligament cells. *J. Periodontol* 78, 1803-1809.
- Nakaya, H., Oates, T. W., Hoang, A. M., Kamoi, K., and Cochran, D. L. (1997). Effects of interleukin-1 beta on matrix metalloproteinase-3 levels in human periodontal ligament cells. *J. Periodontol* 68, 517-523.
- Nakayama, K. (2009). Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J. Biochem* 146, 757-765.
- Nanci, A., and Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol.* 2000 40, 11-28.
- Navarro, M., Valentinis, B., Belletti, B., Romano, G., Reiss, K., and Baserga, R. (2001). Regulation of Id2 gene expression by the type 1 IGF receptor and the insulin receptor substrate-1. *Endocrinology* 142, 5149-5157.
- Nemetski, S. M., and Gardner, L. B. (2007). Hypoxic regulation of Id-1 and activation of the unfolded protein response are aberrant in neuroblastoma. *J. Biol. Chem* 282, 240-248.
- Neumann, G. M., and Bach, L. A. (1999). The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor-binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry. *J. Biol. Chem* 274, 14587-14594.
- Nizet, V., and Johnson, R. S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol* 9, 609-617.
- Nokhbehsaim, M., Winter, J., Rath, B., Jäger, A., Jepsen, S., and Deschner, J. (2011). Effects of enamel matrix derivative on periodontal wound healing in an inflammatory environment in vitro. *J. Clin. Periodontol* 38, 479-490.
- Norton, J. D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell. Sci* 113 (Pt 22), 3897-3905.

- O'Connor, J. C., McCusker, R. H., Strle, K., Johnson, R. W., Dantzer, R., and Kelley, K. W. (2008). Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology. *Cell. Immunol* 252, 91-110.
- Ohlsson, C., Mohan, S., Sjögren, K., Tivesten, A., Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J.-O., and Svensson, J. (2009). The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr. Rev* 30, 494-535.
- Ohyama, H., Nishimura, F., Meguro, M., Takashiba, S., Murayama, Y., and Matsushita, S. (2002). Counter-antigen presentation: fibroblasts produce cytokines by signalling through HLA class II molecules without inducing T-cell proliferation. *Cytokine* 17, 175-181.
- Orlandini, M., and Oliviero, S. (2001). In fibroblasts Vegf-D expression is induced by cell-cell contact mediated by cadherin-11. *J. Biol. Chem* 276, 6576-6581.
- Osborn, J. W. (1981). *Dental anatomy and embryology* (Oxford: Blackwell).
- Otrock, Z. K., Hatoum, H. A., Awada, A. H., Ishak, R. S., and Shamseddine, A. I. (2009). Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: structure, regulation and clinical perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 70, 93-102.
- Page, R. C., and Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol.* 2000 14, 9-11.
- Park, J. H., Park, B. H., Kim, H. K., Park, T. S., and Baek, H. S. (2002). Hypoxia decreases Runx2/Cbfa1 expression in human osteoblast-like cells. *Mol. Cell. Endocrinol* 192, 197-203.
- Park, J.-C., Kim, J.-M., Jung, I.-H., Kim, J. C., Choi, S.-H., Cho, K.-S., and Kim, C.-S. (2011). Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21449989> [Accessed April 23, 2011].
- Patel, S., Lochhead, P. A., Rena, G., Fumagalli, S., Pende, M., Kozma, S. C., Thomas, G., and Sutherland, C. (2002). Insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression is dependent on the mammalian target of rapamycin, but independent of ribosomal S6 kinase activity. *J. Biol. Chem* 277, 9889-9895.
- Peet, D., and Linke, S. (2006). Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found. Symp* 272, 37-49; discussion 49-53, 131-140.
- Perks, C. M., Newcomb, P. V., Norman, M. R., and Holly, J. M. (1999). Effect of insulin-like growth factor binding protein-1 on integrin signalling and the induction of apoptosis in human breast cancer cells. *J. Mol. Endocrinol* 22, 141-150.
- Perks, C. M., Vernon, E. G., Rosendahl, A. H., Tonge, D., and Holly, J. M. P. (2007). IGF-II and IGFBP-2 differentially regulate PTEN in human breast cancer cells. *Oncogene* 26, 5966-5972.

- Pessoa, L., Galvão, V., and Santos-Neto, L. (2011). Periodontal disease as a risk factor for cardiovascular disease: Suggestion of a further link in systemic lupus erythematosus. *Med Hypotheses*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21601991> [Accessed July 6, 2011].
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., and Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet* 366, 1809-1820.
- Pons, S., and Torres-Aleman, I. (2000). Insulin-like growth factor-I stimulates dephosphorylation of ikappa B through the serine phosphatase calcineurin (protein phosphatase 2B). *J. Biol. Chem* 275, 38620-38625.
- Preshaw, P. M., Seymour, R. A., and Heasman, P. A. (2004). Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dent Update* 31, 570-572, 574-578.
- Prisco, M., Peruzzi, F., Belletti, B., and Baserga, R. (2001). Regulation of Id gene expression by type I insulin-like growth factor: roles of Stat3 and the tyrosine 950 residue of the receptor. *Mol. Cell. Biol* 21, 5447-5458.
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J. Biol. Chem* 272, 11205-11214.
- Qin, L., Wang, Y., Tao, L., and Wang, Z. (2011). AKT down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor as a negative feedback. *J. Biochem* 150, 151-156.
- Radlanski, R. J. (2011). *Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie* (Berlin [u.a.]: Quintessenz-Verl.).
- Radulescu, R. T. (1994). Nuclear localization signal in insulin-like growth factor-binding protein type 3. *Trends Biochem. Sci* 19, 278.
- Rajah, R., Katz, L., Nunn, S., Solberg, P., Beers, T., and Cohen, P. (1995). Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog. Growth Factor Res* 6, 273-284.
- Rajah, R., Valentinis, B., and Cohen, P. (1997). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J. Biol. Chem* 272, 12181-12188.
- Rajaram, S., Baylink, D. J., and Mohan, S. (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev* 18, 801-831.
- Rechler, M. M. (1993). Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam. Horm* 47, 1-114.
- Rescala, B., Rosalem, W., Teles, R. P., Fischer, R. G., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Gustafsson, A., and Figueredo, C. M. (2010). Immunologic and

- microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J. Periodontol* 81, 1308-1316.
- Resch, Z. T., Oxvig, C., Bale, L. K., and Conover, C. A. (2006). Stress-activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts. *Endocrinology* 147, 885-890.
- Richard, D. E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem* 274, 32631-32637.
- Ricort, J.-M., and Binoux, M. (2002). Insulin-like growth factor-binding protein-3 activates a phosphotyrosine phosphatase. Effects on the insulin-like growth factor signaling pathway. *J. Biol. Chem* 277, 19448-19454.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R. E. (1978a). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89, 283-286.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R. E. (1978b). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem* 253, 2769-2776.
- Rios, H. F., Ma, D., Xie, Y., Giannobile, W. V., Bonewald, L. F., Conway, S. J., and Feng, J. Q. (2008). Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *J. Periodontol* 79, 1480-1490.
- Le Roith, D. (2003). The insulin-like growth factor system. *Exp. Diabetes Res* 4, 205-212.
- Roodman, G. D., Kurihara, N., Ohsaki, Y., Kukita, A., Hosking, D., Demulder, A., Smith, J. F., and Singer, F. R. (1992). Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J. Clin. Invest* 89, 46-52.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Methods in molecular biology., S. Misener and S. A. Krawetz, eds. (Totowa N.J: Humana Press), pp. 365-386.
- Rubin, J. B., Shia, M. A., and Pilch, P. F. (1983). Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation in vitro by insulin-like growth factor I. *Nature* 305, 438-440.
- Ryu, M. H., Park, H. M., Chung, J., Lee, C. H., and Park, H. R. (2010). Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 393, 11-15.
- Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem* 272, 22642-22647.

- Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D., and Brodt, P. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr. Rev* 28, 20-47.
- Samstein, B., Hoimes, M. L., Fan, J., Frost, R. A., Gelato, M. C., and Lang, C. H. (1996). IL-6 stimulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 production. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 228, 611-615.
- Sanz, M., and van Winkelhoff, A. J. (2011). Periodontal infections: understanding the complexity--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol* 38 Suppl 11, 3-6.
- Sato, A., Nishimura, S., Ohkubo, T., Kyogoku, Y., Koyama, S., Kobayashi, M., Yasuda, T., and Kobayashi, Y. (1993). Three-dimensional structure of human insulin-like growth factor-I (IGF-I) determined by 1H-NMR and distance geometry. *Int. J. Pept. Protein Res* 41, 433-440.
- Schedlich, L. J., O'Han, M. K., Leong, G. M., and Baxter, R. C. (2004). Insulin-like growth factor binding protein-3 prevents retinoid receptor heterodimerization: implications for retinoic acid-sensitivity in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 314, 83-88.
- Schedlich, L. J., Le Page, S. L., Firth, S. M., Briggs, L. J., Jans, D. A., and Baxter, R. C. (2000). Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. *J. Biol. Chem* 275, 23462-23470.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schmid, C., Schläpfer, I., Waldvogel, M., Meier, P. J., Schwander, J., Böni-Schnetzler, M., Zapf, J., and Froesch, E. R. (1992). Differential regulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 mRNA in liver and bone cells by insulin and retinoic acid in vitro. *FEBS Lett* 303, 205-209.
- Schroeder, H. (1986). *Handbook of microscopic anatomy*, (Berlin ;New York [etc.]: Springer).
- Schroeder, H. E. (2000). *Orale Strukturbiologie* 5th ed. (Stuttgart [u.a.]: Thieme).
- Schütt, B. S., Langkamp, M., Rauschnabel, U., Ranke, M. B., and Elmlinger, M. W. (2004). Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J. Mol. Endocrinol* 32, 859-868.
- Scott, C. D., Martin, J. L., and Baxter, R. C. (1985). Rat hepatocyte insulin-like growth factor I and binding protein: effect of growth hormone in vitro and in vivo. *Endocrinology* 116, 1102-1107.
- Semenza, G. L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19, 176-182.
- Semenza, G. L. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci. STKE* 2007, cm8.

- Semenza, G. L. (2000). Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir. Res* 1, 159-162.
- Semenza, G. L. (2009). Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 24, 97-106.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem* 271, 32529-32537.
- Shen, Q., and Singh, P. (2004). Identification of a novel SP3 binding site in the promoter of human IGFBP4 gene: role of SP3 and AP-1 in regulating promoter activity in CaCo2 cells. *Oncogene* 23, 2454-2464.
- Shimasaki, S., and Ling, N. (1991). Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog. Growth Factor Res* 3, 243-266.
- Simmons, S. O., Fan, C.-Y., and Ramabhadran, R. (2009). Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol. Sci* 111, 202-225.
- Socransky, S. S., and Haffajee, A. D. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol.* 2000 5, 7-25.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., and Kent, R. L., Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol* 25, 134-144.
- Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. R., and Foster, R. A. (1988). A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res* 67, 66-70.
- Stewart, C. E., and Rotwein, P. (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev* 76, 1005-1026.
- Su, Y., Zheng, L., Wang, Q., Bao, J., Cai, Z., and Liu, A. (2010). The PI3K/Akt pathway upregulates Id1 and integrin $\alpha 4$ to enhance recruitment of human ovarian cancer endothelial progenitor cells. *BMC Cancer* 10, 459.
- Sung, M., Jeong, M. S., and Jang, S. B. (2010). Biological characterization and structure based prediction of insulin-like growth factor binding protein-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 403, 230-236.
- Suwanichkul, A., Allander, S. V., Morris, S. L., and Powell, D. R. (1994). Glucocorticoids and insulin regulate expression of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1 through proximal promoter elements. *J. Biol. Chem* 269, 30835-30841.
- Tai, Y.-T., Podar, K., Catley, L., Tseng, Y.-H., Akiyama, M., Shringarpure, R., Burger, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Mitsiades, N., et al. (2003). Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via

- activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Res* 63, 5850-5858.
- Takahashi, Y., Tobe, K., Kadowaki, H., Katsumata, D., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Akanuma, Y., and Kadowaki, T. (1997). Roles of insulin receptor substrate-1 and Shc on insulin-like growth factor I receptor signaling in early passages of cultured human fibroblasts. *Endocrinology* 138, 741-750.
- Tamura, D., Hiraga, T., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Yoneda, T. (2008). Cadherin-11-mediated interactions with bone marrow stromal/osteoblastic cells support selective colonization of breast cancer cells in bone. *Int. J. Oncol* 33, 17-24.
- Tamura, M., and Noda, M. (1994). Identification of a DNA sequence involved in osteoblast-specific gene expression via interaction with helix-loop-helix (HLH)-type transcription factors. *J. Cell Biol* 126, 773-782.
- Tanaka, M., Kitadai, Y., Kodama, M., Shinagawa, K., Sumida, T., Tanaka, S., Oue, N., Yasui, W., and Chayama, K. (2010). Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. *Cancer Sci* 101, 2121-2127.
- Tang, X., Powelka, A. M., Soriano, N. A., Czech, M. P., and Guilherme, A. (2005). PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem* 280, 22523-22529.
- Tazuke, S. I., Mazure, N. M., Sugawara, J., Carland, G., Faessen, G. H., Suen, L. F., Irwin, J. C., Powell, D. R., Giaccia, A. J., and Giudice, L. C. (1998). Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 10188-10193.
- Terasawa, H., Kohda, D., Hatanaka, H., Nagata, K., Higashihashi, N., Fujiwara, H., Sakano, K., and Inagaki, F. (1994). Solution structure of human insulin-like growth factor II; recognition sites for receptors and binding proteins. *EMBO J* 13, 5590-5597.
- Toretsky, J. A., and Helman, L. J. (1996). Involvement of IGF-II in human cancer. *J. Endocrinol* 149, 367-372.
- Torres, A. M., Forbes, B. E., Aplin, S. E., Wallace, J. C., Francis, G. L., and Norton, R. S. (1995). Solution structure of human insulin-like growth factor II. Relationship to receptor and binding protein interactions. *J. Mol. Biol* 248, 385-401.
- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G. L., and Van Obberghen, E. (2002). Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem* 277, 27975-27981.
- Tsukada, H., Ishikawa, H., Nakamura, S., and Yoshida, S. (2000). Developmental changes of the vasculature in the periodontal ligament of rat molars: a

- scanning electron microscopic study of microcorrosion casts. *J. Periodont. Res* 35, 201-207.
- Ullrich, A., Bell, J. R., Chen, E. Y., Herrera, R., Petruzzelli, L. M., Dull, T. J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y. C., and Tsubokawa, M. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313, 756-761.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., and Chen, E. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5, 2503-2512.
- Vallée, S., Fouchier, F., Brémond, P., Briand, C., Marvaldi, J., and Champion, S. (2003). Insulin-like growth factor-1 downregulates nuclear factor kappa B activation and upregulates interleukin-8 gene expression induced by tumor necrosis factor alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 305, 831-839.
- Varela-Nieto, I., Hartl, M., Gorospe, I., and León, Y. (2007). Anti-apoptotic actions of insulin-like growth factors: lessons from development and implications in neoplastic cell transformation. *Curr. Pharm. Des* 13, 687-703.
- Wang, D., Nagpal, M. L., Shimasaki, S., Ling, N., and Lin, T. (1995a). Interleukin-1 induces insulin-like growth factor binding protein-3 gene expression and protein production by Leydig cells. *Endocrinology* 136, 4049-4055.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995b). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 5510-5514.
- Wang, L., Shen, H., Zheng, W., Tang, L., Yang, Z., Gao, Y., Yang, Q., Wang, C., Duan, Y., and Jin, Y. (2011). Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Eng Part A* 17, 1015-1026.
- Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* 3, cm1.
- Wei, L., Hubbard, S. R., Hendrickson, W. A., and Ellis, L. (1995). Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem* 270, 8122-8130.
- Werner, H., and Katz, J. (2004). The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology. *J. Dent. Res* 83, 832-836.
- Wheatcroft, S. B., and Kearney, M. T. (2009). IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab* 20, 153-162.
- Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr. Opin. Cell Biol* 15, 509-514.

- White, M. F. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem* 182, 3-11.
- Williams, H., Johnson, J. L., Jackson, C. L., White, S. J., and George, S. J. (2010). MMP-7 mediates cleavage of N-cadherin and promotes smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc. Res* 87, 137-146.
- Wood, E. R., Shewchuk, L., Hassel, A., Nichols, J., Truesdale, A. T., Smith, D., Carter, H. L., Weaver, K., Barrett, G., Leesnitzer, T., et al. (2009). Discovery of an inhibitor of insulin-like growth factor 1 receptor activation: implications for cellular potency and selectivity over insulin receptor. *Biochem. Pharmacol* 78, 1438-1447.
- Xu, J., Dou, T., Liu, C., Fu, M., Huang, Y., Gu, S., Zhou, Y., and Xie, Y. (2011). The evolution of alternative splicing exons in vascular endothelial growth factor A. *Gene*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782909> [Accessed August 18, 2011].
- Yamada, P. M., and Lee, K.-W. (2009). Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 296, C954-976.
- Yang, D., Elner, S. G., Bian, Z.-M., Till, G. O., Petty, H. R., and Elner, V. M. (2007). Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Exp. Eye Res* 85, 462-472.
- Yuan, G., Nanduri, J., Bhasker, C. R., Semenza, G. L., and Prabhakar, N. R. (2005). Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J. Biol. Chem* 280, 4321-4328.
- Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G. L., and Prabhakar, N. R. (2008). Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J. Cell. Physiol* 217, 674-685.
- Zadeh, S. M., and Binoux, M. (1997). The 16-kDa proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the mitogenic action of fibroblast growth factor on mouse fibroblasts with a targeted disruption of the type 1 IGF receptor gene. *Endocrinology* 138, 3069-3072.
- Zapf, J. (1995). Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins. *Eur. J. Endocrinol* 132, 645-654.
- Zhang, C., Lu, L., Li, Y., Wang, X., Zhou, J., Liu, Y., Fu, P., Gallicchio, M. A., Bach, L. A., and Duan, C. (2011). IGF binding protein-6 expression in vascular endothelial cells is induced by hypoxia and plays a negative role in tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618524> [Accessed July 2, 2011].
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B., Gonzalez, F. J., and Semenza, G. L. (2008a). Mitochondrial autophagy is an

- HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem* 283, 10892-10903.
- Zhang, Y., Hassan, M. Q., Li, Z.-Y., Stein, J. L., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., and Stein, G. S. (2008b). Intricate gene regulatory networks of helix-loop-helix (HLH) proteins support regulation of bone-tissue related genes during osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem* 105, 487-496.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W., and Semenza, G. L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60, 1541-1545.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie von Zahn und Zahnhalteapparat	6
Abb. 2: Darstellung des Faserapparates im PDL	8
Abb. 3: Histologische Querschnitte des PDLs.....	8
Abb. 4: Parodontale Erkrankungen	9
Abb. 5: Entstehung einer Parodontitis	10
Abb. 6: Struktur des HIF-1 α _Proteins	15
Abb. 7: HIF-1 α -Regulation unter chronischer (A) und intermittierender Hypoxie (B).....	16
Abb. 8: Sauerstoff-unabhängige Regulation von HIF-1 α -Protein	17
Abb. 9: Schematische Darstellung des IGF-System	19
Abb. 10: Immunfärbung von Komponenten des IGF-Systems im Zahnhalteapparat	20
Abb. 11: Darstellung des SDR SensorDish Reader®	39
Abb. 12: Sauerstoffsensor und Software.....	39
Abb. 13: Schematische Darstellung des „Verwundungs“-Musters	42
Abb. 14: Zellkultur, gewonnen aus parodontalem Ligament.....	49
Abb. 15: Zellzahlabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von PDL-Zellen unter normoxischen Bedingungen.....	51
Abb. 16: Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von Stimulation mit IGF1 und IL-1 β	51
Abb. 17: Verteilung von HIF-1 α unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.....	53
Abb. 18: BrdU-Assay nach 24h Inkubation mit IGF1 und IL-1 β	54
Abb. 19: WST-1 Assay nach 24h Inkubation mit IGF1 und IL-1 β	55
Abb. 20: Wundheilung in konfluenten PDL-Zellen unter Einfluss von IGF1 und IL-1 β	56
Abb. 21: Wundfüllung in PDL-Zellkulturen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	57
Abb. 22: Agarosegelelektrophorese der entstandenen PCR-Produkte (eigene Primer).....	58
Abb. 23: Regulation von ID1 und ID2 unter verschiedenen Bedingungen.....	61
Abb. 24: Einfluss von IGF1 auf Differenzierungsmarker unter Entzündung	62
Abb. 25: Einfluss von IGF1 auf Differenzierungsmarker unter Hypoxie.....	63
Abb. 26: Einfluss von IGF1 auf Differenzierungsmarker unter Hypoxie und Entzündung	64
Abb. 27: Regulation von IGF1R und IGFBP-3 unter verschiedenen Bedingungen	67
Abb. 28: Einfluss von IGF1 auf das IGF-System unter Entzündung	68
Abb. 29: Einfluss von IGF1 auf das IGF-System unter Hypoxie	68
Abb. 30: Einfluss von IGF1 auf das IGF-System unter Hypoxie und Entzündung	69
Abb. 31: Regulation von IL-1 β und IL-6 unter verschiedenen Bedingungen	72
Abb. 32: Regulation von HIF-1 α und VEGFA unter verschiedenen Bedingungen	72
Abb. 33: Einfluss von IGF1 auf IL-1 β , IL-6 und VEGFA unter Entzündung	73
Abb. 34: Einfluss von IGF1 auf IL-6 und VEGFA unter Hypoxie.....	74
Abb. 35: Einfluss von IGF1 auf IL-1 β und VEGFA unter Hypoxie und Entzündung	75
Abb. 36: Darstellung der Standardkurve aus dem ersten Vorversuch.....	76

Tabellenverzeichnis

Tab. I:	Ansatz für die cDNA-Synthese mittels iScript™ Select Kit	40
Tab. II:	Untersuchte Gene mit ausgewählten Funktionen	41
Tab. III:	Programm für die Echtzeit-PCR	42
Tab. IV:	relative Genexpression im Verhältnis zu β -Aktin	46
Tab. V:	Differenzierungsmarker unter normoxischen Bedingungen	55
Tab. VI:	Differenzierungsmarker unter hypoxischen Bedingungen	56
Tab. VII:	mRNA-Expression von IGF-Systemkomponenten unter normoxischen Bedingungen	61
Tab. VIII:	mRNA-Expression von IGF-Systemkomponenten unter hypoxischen Bedingungen	62
Tab. IX:	mRNA-Expression ausgewählter Zytokine, HIF-1 α und VEGFA unter normoxischen Bedingungen	66
Tab. X:	mRNA-Expression ausgewählter Zytokine, HIF-1 α und VEGFA unter hypoxischen Bedingungen	67
Tab. XI:	Übersicht über Ergebnisse des IGF1-ELISA	74

Verfassererklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die, den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn, Januar 2012

Jan Reckenbeil